

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E. A. P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Seroprevalencia del virus de la diarrea viral en bovinos
de crianza extensiva de la provincia de San Pablo,
departamento de Cajamarca**

TESIS

para optar el título profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Antonio Herrera Rosalino

Lima – Perú

2009

ÍNDICE

RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE CUADROS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. EL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA (VDVB)	3
2.1.1. Taxonomía	3
2.1.2. Morfología	4
2.1.3. Genoma y proteínas virales	4
2.1.3.1. Genoma	4
2.1.3.2. Proteínas virales	5
2.1.4. Variabilidad	8
2.1.5. Biotipos	9
2.1.5.1. No citopático	9
2.1.5.2. Citopático	10
2.1.6. Genotipos	10
2.1.6.1. Genotipo 1	10
2.1.6.2. Genotipo 2	11
2.1.7. Replicación Viral	12
2.2. EPIDEMIOLOGÍA	14
2.2.1. Prevalencia	14
2.2.2. Fuentes de infección	15
2.2.3. Formas de transmisión	15
2.2.3.1. Transmisión horizontal	15
2.2.3.2. Transmisión vertical	16
2.3. PATOGENIA Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS	17
2.3.1. Infecciones agudas	17
2.3.1.1. Infecciones subclínicas	18
2.3.1.2. Complejo diarrea neonatal bovina	18
2.3.1.3. Infecciones respiratorias	19
2.3.1.4. Infecciones del tracto reproductivo	19
2.3.1.5. Inmunosupresión	21
2.3.1.6. Síndrome hemorrágico o infección aguda severa	21
2.3.2. Infección persistente	22
2.3.3. Enfermedad de las mucosas (EM)	22
2.4. RESPUESTA INMUNITARIA EN LAS INFECCIONES POR VDVB	23
2.5. DIAGNÓSTICO	27

2.5.1. Aislamiento en cultivo celular	28
2.5.2. Detección de antígenos virales	28
2.5.2.1. Inmunofluorescencia	29
2.5.2.2. Inmunoperoxidasa	29
2.5.2.3. ELISA de captura de antígenos	30
2.5.3. Detección de anticuerpos	30
2.5.3.1. Neutralización viral (VN)	31
2.5.3.2. Ensayo de inmunoabsorcancia ligada a enzimas (ELISA)	31
2.5.3.3. Serología en leche	32
2.5.4. Detección del ácido nucleico viral	32
2.6. PREVENCIÓN Y CONTROL	33
2.6.1. Implementación de medidas de bioseguridad	34
2.6.2. Identificación y eliminación de animales PI	35
2.6.3. Vacunación	35
III. MATERIALES Y MÉTODOS	38
3.1. LUGAR DE ESTUDIO	38
3.2. MATERIALES	38
3.2.1. Muestras	38
3.2.2. Equipos	39
3.2.3. Reactivos y cultivos celulares	39
3.2.4. Cepa del VDV B	39
3.3. MÉTODOS	40
3.3.1. Tamaño muestral	40
3.3.2. Detección de anticuerpos en suero por neutralización viral	41
3.3.2.1. Lectura	41
3.3.3. Análisis de datos	42
3.3.3.1. Prevalencia a la prueba	42
3.3.3.2. Prevalencia corregida	42
3.3.3.3. Intervalo de confianza	43
3.3.3.4. Prueba de Chi cuadrado	43
3.3.3.5. Regresión Logística	43
IV. RESULTADOS	44
V. DISCUSIÓN	47
VI. CONCLUSIONES	50
VII. BIBLIOGRAFÍA CITADA	51
VIII. APÉNDICE	62

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Distribución de los bovinos muestreados en la provincia de San Pablo, departamento de Cajamarca	40
Cuadro 2. Seroprevalencia corregida del virus de la diarrea viral bovina en la provincia de San Pablo, departamento de Cajamarca, según sexo	44
Cuadro 3. Seroprevalencia corregida del virus de la diarrea viral bovina en la provincia de San Pablo, departamento de Cajamarca, según grupo etario	45
Cuadro 4. Distribución de los títulos de anticuerpos contra el virus de la diarrea viral bovina detectados mediante la prueba de neutralización viral	45
Cuadro 5. Determinación del riesgo de infección con el virus de la diarrea viral bovina en la población de bovinos estudiada según las variables sexo, grupo etario y seropositividad	46

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Morfología estructural propuesta para los pestivirus	4
Figura 2. Organización genómica del VDVB	5
Figura 3. Replicación propuesta para los pestivirus tomado como modelo el VDVB	13

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar la seroprevalencia del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) en bovinos criollos de crianza extensiva sin historia de vacunación, en la provincia de San Pablo, departamento de Cajamarca. Se colectaron 385 muestras de suero de animales divididos en los siguientes grupos etarios: de dos a menores a seis, de seis a menores a 12 y mayores a 12 meses de edad. La detección de anticuerpos contra el VDVB se realizó mediante la prueba de neutralización viral. El $27.1 \pm 4.4\%$ (104/385) de los bovinos presentó anticuerpos contra el VDVB, distribuidos en los tres grupos etarios, no existiendo diferencia estadística entre las edades ($p > 0.05$). El porcentaje de hembras seroreactoras fue de $27.8 \pm 4.5\%$ (79/285) y de machos $25.1 \pm 4.3\%$ (25/100); no existiendo diferencia estadística ($p > 0.05$). Los títulos de anticuerpos estuvieron en un rango de 2 a mayores a 256. El $60.3 \pm 9.4\%$ (50/83) de los animales mayores a 12 meses presentaron los títulos de anticuerpos entre 128 a mayores a 256. Se concluye que el VDVB está presente en la población de bovinos muestreados de la provincia de San Pablo, aunque con una prevalencia baja comparada a similares estudios efectuados en otras zonas del país.

Palabras clave: Virus de la Diarrea Viral Bovina, bovinos criollos, seroprevalencia, neutralización viral

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the seroprevalence of Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) in bovines of extensive rearing without history of vaccination, from the province of San Pablo, department of Cajamarca. There were collected 385 blood serum samples of bovines divided in the following age groups: two to younger than six, six to younger than 12 months and older than 12 months of age. The detection of antibodies against BVDV was made through the viral neutralization test. The $27.1 \pm 4.4\%$ (104/385) of sampled bovines showed antibodies against BVDV, distributed into the three age groups; there was not statistical difference ($p>0.05$). The percentage of seroreactors females was $27.8 \pm 4.5\%$ (79/285) and males was $25.1 \pm 4.3\%$ (25/100); there was not statistical difference ($p>0.05$). The titles of antibodies were between 2 to higher than 256. The $60.3 \pm 9.4\%$ (50/83) of animals older than 12 months presented titles of antibodies between 128 and higher than 256. In conclusion, BVDV is presented on the population of sampled bovines from the province of San Pablo, although with a lower prevalence compared with similar studies made in other areas of the country.

Key words: Bovine Viral Diarrhea Virus, cross herd, seroprevalence, viral neutralization

I. INTRODUCCIÓN

La población bovina en el Perú está conformada mayormente por ganado criollo, con 3.8 millones de cabezas aproximadamente. El 86% de ésta población son criados en valles interandinos, principalmente en forma extensiva, además de compartir parcelas con otros rumiantes domésticos: ovinos, caprinos y camélidos sudamericanos, y de pertenecer a pequeños y medianos ganaderos con escasa organización y una inadecuada técnica ganadera (INEI, 1996).

Según el Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI), en el III Censo Nacional Agropecuario, el departamento de Cajamarca contaba con una población bovina de un poco más de 600,000 cabezas, de las cuales algo más de 220,000 eran vacas y en la provincia de San Pablo la población fue de 16,339 bovinos (INEI, 1996).

Durante el 2003, el Proyecto de Desarrollo Ganadero (PRODEGAN) de la provincia de San Pablo, realizó un diagnóstico situacional de la actividad pecuaria en esta provincia, determinando que existían aproximadamente 12,620 bovinos, entre las razas Criolla, Holstein y Brown Swiss; atribuyendo la disminución de la población bovina a múltiples factores como el inadecuado manejo de los animales que los predispone a problemas sanitarios, entre los que podría estar relacionado el VDVB.

La Diarrea Viral Bovina (DVB) es una de las enfermedades de mayor distribución en la población bovina (Rivera, 2008), principalmente en cuencas lecheras donde alcanza prevalencias mayores al 50% y siendo causa importante de fallas reproductivas y un componente del complejo respiratorio en bovinos (Rivera *et al.*, 1993). Adicionalmente, la prevalencia de la DVB depende del tipo de ganado, densidad poblacional, tipo de manejo, comercio de animales, manejo de pasturas, entre otros (Houe 1995, 1999; Rivera, 2008).

Las pérdidas estimadas a causa de la DVB pueden variar desde unos pocos miles de dólares hasta cientos de miles, dependiendo de las condiciones de la ganadería del país; ocasionando reducción en la producción de leche, menor tasa de concepción, desórdenes respiratorios, abortos, defectos congénitos, retardo en el crecimiento, entre otros (Houe, 2003).

La industria lechera en el Perú está concentrada básicamente en tres cuencas, Arequipa, Lima y Cajamarca (MINAG, 1996). Actualmente existe interés del desarrollo de la ganadería en los valles interandinos con disponibilidad forrajera. Sin embargo, en muchas de estas zonas con gran potencial ganadero como es el caso de la ganadería de la provincia de San Pablo en Cajamarca, no se cuenta con informaciones sanitarias respecto a enfermedades que limitan el desarrollo ganadero.

El objetivo del presente estudio es determinar la seroprevalencia del VDVB en animales criollos de la provincia de San Pablo, departamento de Cajamarca; y contribuir a un mejor conocimiento de la epidemiología de esta enfermedad en el país.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. EL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA

El virus de la diarrea viral bovina (VDVB) es un importante patógeno del bovino con una amplia distribución mundial (Peterhans *et al.*, 2003; Tajima y Dubovi, 2005; Hilbe *et al.*, 2007), este virus ocasiona considerables pérdidas económicas a la industria ganadera (Botton *et al.*, 1998; Chimeno *et al.*, 2007). Las pérdidas son ocasionadas por los abortos, diarreas, síntomas respiratorios, disminución de la fertilidad y al estado de animales persistentemente infectados (PI) en bovinos (Hilbe *et al.*, 2007; Yamane *et al.*, 2008).

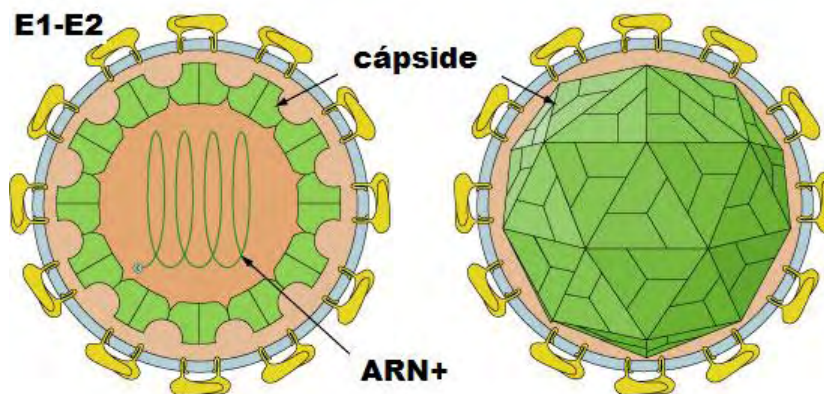
2.1.1. Taxonomía

El VDVB actualmente pertenece al género *Pestivirus*, de la familia *Flaviviridae* (Becher *et al.*, 1997; Goyal y Ridpath, 2005; Chimeno *et al.*, 2007; Tang y Zhang, 2007; Fan y Wang, 2009). Dentro de este mismo género se encuentra el virus de la peste porcina clásica (VPPC) y el virus de la enfermedad de la frontera (VEF) del ovino, con los que el VDVB se encuentra muy relacionado tanto antigénica como genéticamente (Rondón, 2006; Bachofen *et al.*, 2008). Adicionalmente a estos pestivirus, se han reconocido tres especies putativas aisladas de jirafa, reno y antílope (Goyal y Ridpath, 2005). También, los pestivirus pueden cruzar barreras de hospederos de diferente especie e infectar otras especies del orden *Artiodactyla* (Rondón, 2006; Tang y Zhang, 2007).

2.1.2. Morfología

El VDVB es una partícula esférica de 40–60 nm de diámetro (Gray y Nettleton, 1987; Murphy *et al.*, 1999; Goyal y Ridpath, 2005), constituido por una nucleocápside icosaédrica entre 25–37 nm de diámetro, protegida por una cápside proteica rodeada por una membrana fosfolipídica (Lértora, 2003), con tres glicoproteínas ancladas a ella: E^{ms}, E1 y E2 (Goyal y Ridpath, 2005).

Figura 1. Morfología estructural propuesta para los pestivirus (Viral Zone, 2008)



2.1.3. Genoma y proteínas virales

2.1.3.1. Genoma

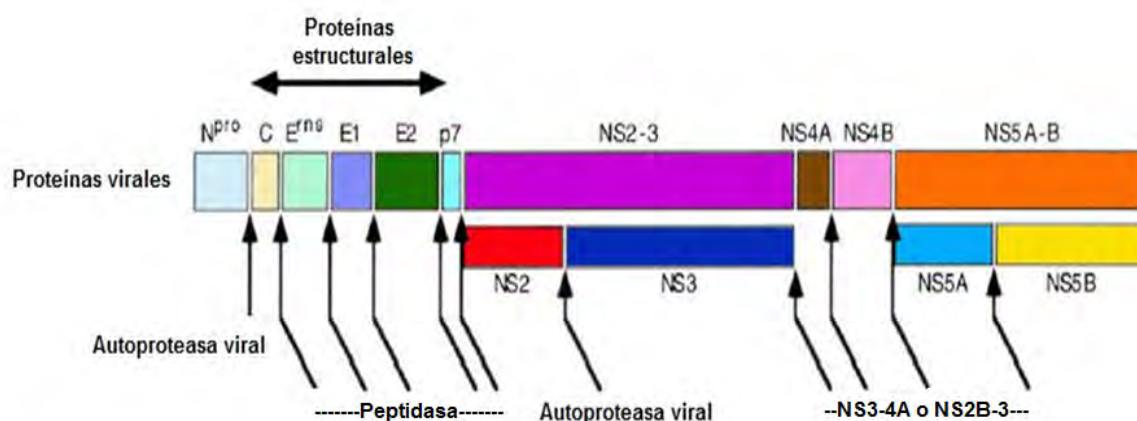
El VDVB posee un genoma lineal compuesto por una simple cadena de ARN de polaridad positiva de aproximadamente 12.5 kilobases (kb) de longitud (Murphy *et al.*, 1999; Flores *et al.*, 2002; Brackenburry y Charleston, 2003; Bolin y Grooms, 2004; Chimeno *et al.*, 2007). Este virus posee un simple marco de lectura abierto (ORF) flanqueado por regiones no traducidas (UTR) 5' (360–390 bases) y 3' (200–240 bases) (Goyal y Ridpath, 2005).

El ORF codifica una simple poliproteína de alrededor de 4,000 aminoácidos (Vilček *et al.*, 2001; Nagai *et al.*, 2008). El terminal 5' no contiene una estructura "cap" y la extensión poli(A) no está presente en el extremo final 3'. Además, todos los genomas pestivirales terminan en el extremo 3' con una extensión poli(C) corta. Finalmente, la secuencia de ácidos nucleicos más conservada entre los pestivirus se encuentra en el extremo 5'UTR (Goyal y Ridpath, 2005).

2.1.3.2. Proteínas virales

La poliproteína es co-traduccionalmente y post-traduccionalmente partida por proteasas virales y celulares en 11–12 proteínas estructurales y no estructurales (Vilček *et al.*, 2001). La región adyacente al extremo 5'UTR codifica una autoproteasa no estructural específica de los pestivirus (N^{pro}), seguida por las regiones codificantes para cuatro proteínas estructurales, la proteína de la cápside (C) y las glicoproteínas de la envoltura viral: E^{ns} , E1 y E2 (Bachofen *et al.*, 2008) y las proteínas no estructurales: p7, NS2-3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B (Becher *et al.* 1997, 2000; Isken *et al.*, 2004; Murray *et al.*, 2008; Fan y Wang, 2009).

Figura 2. Organización genómica del VDVB (Isken *et al.*, 2004)



Las proteínas estructurales y no estructurales, en orden de secuencia, codificadas por el genoma viral son:

- **N^{pro}/p20:** Es la primera proteína no estructural traducida del ORF y cumple la función de autoproteasa (Vilček *et al.*, 2001), generado del extremo N-terminal de la proteína C/p14 (Tautz *et al.*, 1999; Harada *et al.*, 2000, Agapov *et al.*, 2004). Esta proteína no es requerida para la replicación del ARN viral (Goyal y Ridpath, 2005).
- **C/p14:** Es la segunda proteína generada y es la más abundante. Constituye la cápside y antígeno del grupo viral. Su función es empaquetar el ARN genómico y proveer las interacciones necesarias donde se anclará la envoltura del virión (Potgieter, 1995). Esta proteína no provoca una respuesta de anticuerpos en el ganado (Chase *et al.*, 2004).
- **E^{ns}/E0/gp48:** Glicoproteína bien conservada que induce altos niveles de anticuerpos aunque con escasa capacidad neutralizante (Iqbal *et al.*, 2000; Chase *et al.*, 2004). Es una ARNasa secretada al espacio extracelular por exocitosis durante la replicación viral (Tautz *et al.*, 1999).
- **E1/gp25:** Es otra glicoproteína de envoltura que se ha encontrado en viriones covalentemente unidos al E2/gp53 por puentes disulfuro. Esta proteína no induce una respuesta humoral significativa (Chase *et al.*, 2004).
- **E2/gp53:** Es la principal glicoproteína y objetivo antigénico de los anticuerpos (Chase *et al.*, 2004). Esta glicoproteína es muy antigénica (Tang y Zhang, 2007) e induce la producción de anticuerpos neutralizantes luego de una infección (Chimeno *et al.*, 2007) o vacunación con vacunas vivas o muertas (Chase *et al.*, 2004). Además, está asociada con otras actividades biológicas, incluyendo unión al receptor de la célula y ensamblaje viral (Tang y Zhang, 2007).
- **p7:** Es una proteína no estructural que parece ser esencial para la producción y ensamblaje de virus infeccioso. Esta proteína no es requerida para la replicación del ARN viral (Goyal y Ridpath, 2005; Murray *et al.*, 2008).

- **NS2-3/p125:** Es una proteína no estructural altamente conservada entre todos los pestivirus (Deregt *et al.*, 2005), posee propiedades de helicasa y proteasa, indispensable en la replicación viral; cuenta con dos dominios que actúan por separado, NS2/p54 y NS3/p80, cada uno con distintas propiedades químicas (Potgieter, 1995). El ganado infectado o vacunado con virus modificado desarrolla una fuerte respuesta humoral contra este polipéptido; mientras que la vacuna a virus muerto produce una respuesta insignificante. Los anticuerpos contra NS2-3/p125 producen reacción cruzada entre VDVB, VPPC y VEF (Potgieter, 1995; Chase *et al.*, 2004).

- **NS2/p54:** Es un producto proteolítico de la NS2-3/p125. Esta proteína tiene una actividad de unión en el ARN (Potgieter, 1995). Posee un dominio tipo Zinc-finger (Goyal y Ridpath, 2005).

- **NS3/p80:** Es un producto proteolítico de la NS2-3/p125, determinando el fenotipo del VDVB. Esta proteína tiene actividad de NTPasa en el extremo amino terminal y de helicasa en el extremo carbono terminal (Potgieter, 1995; Xu *et al.*, 1997; Agapov *et al.*, 2004; Deregt *et al.*, 2005). La NS3/p80 es una proteína altamente conservada en el biotipo CP (Xu *et al.*, 1997; Tautz y Thiel, 2003; Chase *et al.*, 2004; Goyal y Ridpath, 2005) y se produce por mutaciones o recombinaciones entre el ARN del VDVB y ARN celular o duplicaciones del ARN viral (Elahi *et al.*, 1999). La proteína NS3 es un antígeno inmunodominante en las respuestas de anticuerpo en terneros inmunizados (Lambot *et al.*, 1997; Goyal y Ridpath, 2005).

- **NS4A/p10:** Es una proteína no estructural hidrofóbica que participa como un esencial cofactor de la NS2-3/p125 (Goyal y Ridpath, 2005) y la serina proteasa NS3/p80 (Harada *et al.*, 2000; Tautz y Thiel, 2003; Agapov *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2006).

- **NS4B/p32:** Es una proteína no estructural hidrofóbica (Goyal y Ridpath, 2005). Es un importante modulador de la citopatogenicidad de la cepa NADL del VDVb y se encuentra asociado a la producción del NS3/p80 del fenotipo CP (Qu *et al.*, 2001). Esta proteína es un componente de la replicasa (Goyal y Ridpath, 2005).
- **NS5A/p58:** Es una fosfoproteína serina que está íntimamente asociada con una o más quinasas celulares (Qu *et al.*, 2001). También, es un componente de la replicasa (Goyal y Ridpath, 2005).
- **NS5B/p75:** Es el ARN polimerasa dependiente de ARN viral (RdRp) (Xu *et al.*, 1997; Qu *et al.*, 2001; Tautz y Thiel, 2003; Agapov *et al.*, 2004; Goyal y Ridpath, 2005; Choi *et al.*, 2006). Esta proteína ha sido directamente implicada en la morfogénesis del VDVb (Murray *et al.*, 2008).

2.1.4. Variabilidad

La principal característica del VDVb es su variabilidad genética y antigénica, debido a modificaciones genómicas que involucran mutaciones puntuales o recombinaciones del ARN (homólogos y no homólogos) (Ridpath, 2003; Bolin y Grooms, 2004).

Las mutaciones puntuales son de ocurrencia regular, causando sustituciones de bases de alta frecuencia (1 error por cada 10,000 nucleótidos del ARN viral), debido a una falla de la ARN polimerasa, responsable de la replicación del ARN viral. La habilidad de generar mutantes constantemente, permite al virus adaptarse rápidamente a la respuesta del hospedero, estableciéndose en algunos casos, infecciones persistentes o crónicas (Bolin y Grooms, 2004). Esta habilidad para mutar rápidamente permite al virus estar mejor adaptado para la replicación en el hospedero y escapar de la respuesta inmunitaria (Becher *et al.*, 2000).

Según Bolin y Ridpath (1992), las nuevas variantes antigénicas se pueden originar durante el pasaje del virus en bovinos susceptibles que desarrollan una infección aguda, proponiendo que, mientras los animales PI son más importantes como reservorios, los animales con infección aguda pueden ser más importantes para la generación de nuevas variantes antigénicas.

2.1.5. Biotipos

Una propiedad de los pestivirus de rumiantes es la habilidad de replicarse en cultivos celulares con o sin efectos citopáticos, particularmente en el VDVB se pueden distinguir dos biotipos (o fenotipos): no citopático (NCP) y citopático (CP), (Becher *et al.*, 1997; Fulton *et al.*, 2000; Bolin y Grooms, 2004; Deregt *et al.*, 2005; Fulton *et al.*, 2005; Fan y Wang, 2009).

2.1.5.1. No Citopático

El biotipo NCP es la forma original del virus, no ocasiona cambios visibles en el cultivo celular y la célula infectada parece normal. Sin embargo, esto no implica que los biotipos NCP sean no patogénicos. Por el contrario, es el biotipo predominante en la naturaleza, aislado de la mayoría de las formas clínicas y el único capaz de originar infección persistente (Lértora, 2003; Bolin y Grooms, 2004). El VDVB-NCP presenta afinidad por células linfocitarias (Rondón, 2006).

El VDVB-NCP sirve como virus matriz desde el cual se producirá el VDVB-CP luego de recombinaciones homólogas o heterólogas en el ARN viral no citopático (Bolin y Grooms, 2004). Este biotipo es considerado el más importante porque al infectar vacas gestantes durante el primer tercio de la gestación, cuando el sistema inmune del feto es inmaduro, puede dar lugar al nacimiento de animales inmunotolerantes al virus y con infección persistente (PI); estos animales PI emiten grandes cantidades de VDVB durante toda su vida y sirven como una fuente efectiva

de transmisión viral a otros bovinos tanto como a otras especies (Gripshover *et al.*, 2007).

2.1.5.2. Citopático

El biotipo CP ocasiona vacuolización y muerte celular en los cultivos celulares. El biotipo CP se aísla únicamente de animales con enfermedad mucosa y se originan por mutación a partir del biotipo NCP; ya sea por depleción de fragmentos del genoma viral, inserción de fragmentos de ARN celular o duplicación y reordenamiento del ARN viral (Lértora, 2003; Bolin y Grooms, 2004). El VDVB-CP infecta de manera predominante células epiteliales (Rondón, 2006).

A nivel molecular, el biotipo CP es diferente al NCP porque posee, además de la proteína no estructural NS2-3/p125, la proteína NS3/p80, la cual confiere el fenotipo citopático al virus (Potgieter, 1995; Bolin y Grooms, 2004).

2.1.6. Genotipos

El VDVB se agrupa en 2 genotipos, el genotipo 1 (VDVB-1) y genotipo 2 (VDVB-2) (Flores *et al.*, 2002; Endsley *et al.*, 2004; Fulton *et al.*, 2005; Fan y Wang, 2009), basados en la secuencia de nucleótidos 5'UTR del genoma viral (Tajima y Dubovi, 2005) y las diversidades antigénicas en la glicoproteína viral E2 (Fan y Wang, 2009). Además, los virus de ambos genotipos pueden ser de los dos biotipos, citopático y no citopático (Iqbal *et al.*, 2000; Ridpath, 2003; Baxi *et al.*, 2006; Gripshover *et al.*, 2007).

2.1.6.1. Genotipo 1

El VDVB-1 actualmente puede ser dividido en 13 subgenotipos (Bachofen *et al.*, 2008; Nagai *et al.*, 2008). De todos éstos, los más comúnmente aislados son los VDVB-1a y VDVB-1b, siendo más prevalente en EEUU el subtipo VDVB-1b (Fulton

et al., 2003). El VDVb-1 ha sido reconocido por muchos años y ampliamente distribuido en el mundo (Vilček *et al.*, 2001) y ha sido identificado de cepas usadas para pruebas diagnósticas, investigación y elaboración de vacunas, el VDVb-1a incluye las cepas prototipo de laboratorio: NADL, SD-1 y Singer; y el VDVb-1b incluye a las cepas NY-1, Osloss y C-60F (Tajima y Dubovi, 2005).

Se han propuesto varias diferencias biológicas en determinantes antigénicos entre los subgenotipos del VDVb-1, incluyendo títulos comparativos de neutralización viral y la respuesta selectiva en animales PI para virus extraños al subgenotipo de su virus persistente, pero no para virus dentro de su mismo subgenotipo (Fulton *et al.*, 2003).

En un primer estudio sobre diversidad genética del VDVb en el Perú, utilizando en el análisis filogenético la región 5'UTR del virus, se ha concluido que las cepas circulantes en el país son del genotipo 1, y que el VDVb-1b es el subgenotipo predominante (Ståhl *et al.*, 2009).

2.1.6.2. Genotipo 2

El VDVb-2 puede ser dividido en 2 subgenotipos (VDVB-2a y VDVb-2b) (Ridpath, 2003; Bachofen *et al.*, 2008). Este genotipo ha sido aislado de cepas virales procedentes de animales PI y una enfermedad aguda hemorrágica fatal en EEUU y Canadá conocida como Síndrome Hemorrágico. El VDVb-2 fue primero identificado en los noventa (1990) en Norteamérica y ha sido esporádicamente detectada en otros países tales como Japón, Alemania y Bélgica (Vilček *et al.*, 2001); y en América Latina, en Brasil, Argentina y Chile (Flores *et al.*, 2000; Odeón *et al.*, 2003; Pizarro-Lucero *et al.*, 2006).

Las cepas de referencia del VDVb-2a son la 890, CD87 y NVSL125 (Tajima y Dubovi, 2005). De los dos subgenotipos del VDVb-2 presentes, se ha evidenciado

que en los EEUU los aislados del VDVB-2a predominan sobre los del VDVB-2b, estos últimos considerados un evento raro (Ridpath *et al.*, 2006).

2.1.7. Replicación Viral

El VDVB después de entrar en contacto con membranas mucosas de la boca o nariz, empezará la replicación en las células epiteliales con una predilección por las tonsilas palatinas, especialmente las células epiteliales de la cripta. El VDVB presenta tropismo por células mitóticamente activas como: linfocitos, fagocitos, mononucleares y células epiteliales (Rondón, 2006).

La replicación del ARN pestiviral ocurre en el citoplasma de las células infectadas (Becher *et al.*, 2000). El genoma del pestivirus consiste de una simple cadena de ARN de polaridad positiva, la cual sirve como plantilla para la traducción y replicación (Li y McNally, 2001). La replicación comienza con la adhesión a la membrana plasmática y la penetración en la célula, parece ser que el receptor específico es una proteína de superficie de 50 kD de las células, por mediación de la proteína de envoltura E2 (Iqbal *et al.*, 2000); sin embargo según Maurer *et al.* (2004) sugieren a la CD46 (cofactor proteico de membrana) como posible receptor del VDVB. Seguidamente, ocurre la fusión de la envoltura con la membrana endosomal (dependiente de pH), y el virus ingresa al citoplasma mediante endocitosis mediada por receptor y libera su genoma en el citosol (Johnson *et al.*, 2001; Rondón, 2006).

Posteriormente, el ARN genómico es traducido por el reclutamiento de los factores de iniciación de la traducción mediados por el sitio de entrada interno al ribosoma (IRES), el cual está presente en la región 5'UTR, promoviendo la iniciación de la traducción de la poliproteína viral. Entonces, nuevas proteínas no estructurales sintetizadas arman complejos funcionales de replicasa y llevan a cabo el primer paso de la replicación del genoma, la síntesis del ARN de cadena negativa (antigenoma). Luego, la replicasa deberá completar la síntesis de la progenie de ARN de cadena positiva usando el ARN antigenómico como plantilla (Johnson *et al.*, 2001).

Después, la producción de glicoproteínas de la envoltura requiere de la participación del retículo endoplasmático, implicando en el proceso un mecanismo de señalización celular. Luego de la traducción del ORF en una poliproteína viral, las proteasas virales y celulares cortan el polipéptido naciente en sitios específicos para generar proteínas virales intermedias y/o maduras (Leyssen *et al.*, 2000).

Por último, luego de la replicación, el genoma viral es encapsidado por la proteína C/p14 y dirigido al retículo endoplasmático o al aparato de Golgi, donde el virus inmaduro, rodeado por una envoltura lipídica conteniendo proteínas, surge hacia el lumen (Leyssen *et al.*, 2000). La maduración del virus incluye la estabilización conformacional por el plegamiento de las glicoproteínas E1-E2 (glicosilación), los viriones intactos son liberados por germinación en la cisterna del retículo endoplasmático (Goyal y Ridpath, 2005). Finalmente, los virus maduros son liberados en el espacio extracelular mediante exocitosis (Leyssen *et al.*, 2000).

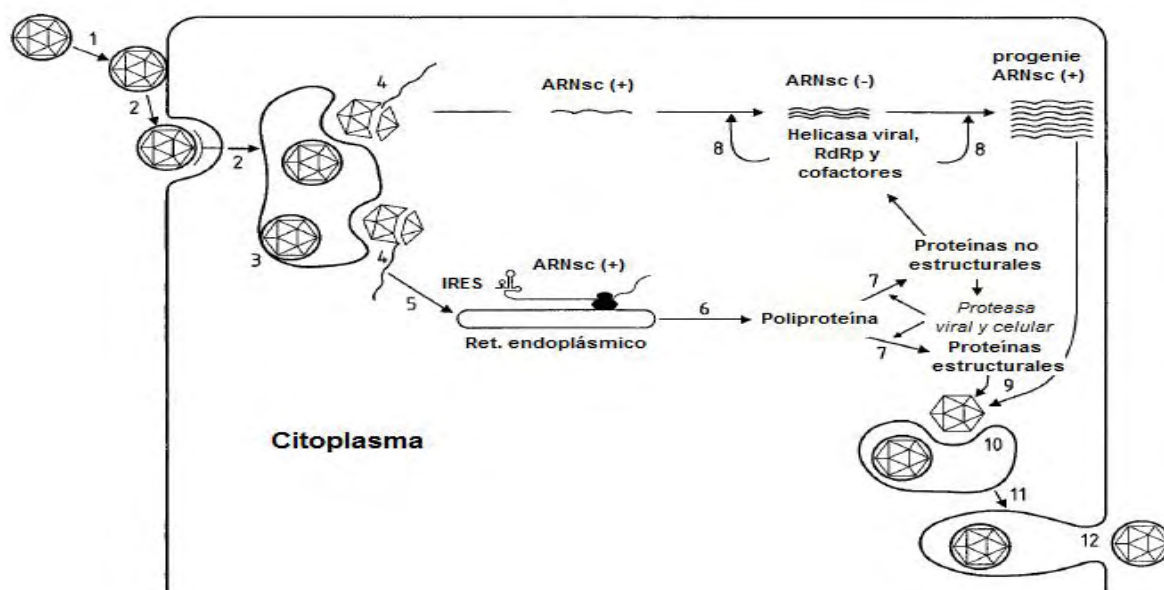


Figura 3. Replicación propuesta para los pestivirus tomado como modelo el VDVB (Leyssen *et al.*, 2000) 1 adsorción, 2 endocitosis mediada por receptor, 3 fusión en los lisosomas a pH bajo, 4 desnudamiento, 5 iniciación de la traducción mediada por IRES, 6 traducción del ARN viral en un precursor de la proteína viral, 7 procesamiento proteolítico co-traducción y post-traducción de la proteína viral por las proteasas celulares y virales, 8 síntesis asociada a membrana del ARN de cadena negativa y la progenie de ARN de cadena positiva, 9 ensamblaje de la nucleocápside, 10 formación de los viriones en el retículo endoplasmático, 11 transporte y maduración de los viriones en el retículo endoplasmático y el complejo de Golgi, 12 Fusión de vesícula y liberación de los viriones por exocitosis. ss (simple cadena).

2.2. EPIDEMIOLOGÍA

2.2.1. Prevalencia

Los pestivirus infectan naturalmente a los animales ungulados del orden *Artiodactyla* como bovinos, porcinos, ovinos, caprinos, alpacas, búfalos de agua y rumiantes silvestres (Houe, 1995). El éxito del virus en los rumiantes es debido a su habilidad de cruzar la barrea placentaria, invadir el feto y generar una infección persistente que continúa durante la vida postnatal, clínicamente inaparente, excretando el virus y diseminándolo a un amplio rango de hospederos (Becher *et al.*, 1997).

El VDVB es una enfermedad endémica en la población bovina de muchos países, alcanzando niveles de 60 a 80% de bovinos seropositivos y 0.5 a 2% de animales PI y ocasionando pérdidas económicas (Houe, 1995; Lértora, 2003). En algunos países de Sudamérica como Brasil, Argentina, Colombia y Chile se reportan prevalencias con variaciones entre regiones, pero con tasas superiores al 70% (Rivera, 2008).

La DVB fue introducida al Perú en la década del 60 con la importación de vaquillas de un país donde la enfermedad era endémica (Rivera 1993, 2008). Es por esta razón que mediante estudios epidemiológicos realizados por investigadores de la FMV-UNMSM han determinado que la DVB se encuentra difundida en la población bovina del país.

Estos estudios realizados en poblaciones bovinas tales como Huamán *et al.* (2007) mostraron una prevalencia de $98.1 \pm 1.9\%$ en la irrigación de Majes, Arequipa. También, Rivera *et al.* (2001) determinaron una prevalencia en la provincia de Parinacochas (Ayacucho) de $85.3 \pm 3.2\%$. En otras zonas del país, como en el valle del Mantaro, provincia de Huancayo (Junín) se encontraron prevalencias de $72.4 \pm 5.8\%$ (Contreras *et al.*, 2000) y $70.9 \pm 7.8\%$ (Rivera *et al.*, 2003), y en Lima se

obtuvo una prevalencia de $56.0 \pm 5.5\%$ (Aguilar *et al.*, 2006). Finalmente, en las provincias de Calca (Cusco) y Melgar (Puno) se determinaron prevalencias de $90.9 \pm 6.9\%$ y $47.8 \pm 0.05\%$, respectivamente (Cabello *et al.*, 2006; Quispe *et al.*, 2008).

2.2.2. Fuentes de infección

Existen varias fuentes de infección pero la principal es a través de los animales PI (Ferrari *et al.*, 1999; Mainar-Jaime *et al.*, 2001; Bolin y Grooms, 2004; Endsley *et al.*, 2004). Estos animales pueden infectar al 90% de los animales con los que conviven en un período de 3 a 4 meses (Houe, 1999). Los animales PI eliminan el virus durante toda su vida a través de secreciones y excreciones como la saliva, orina, heces (Niskanen y Lindberg, 2003), descargas nasales, leche, semen y lágrimas (Houe, 1995).

A parte de los bovinos, el VDVB ha sido aislado en muchos otros animales, como son las ovejas, cabras, camellos, rumiantes silvestres y porcinos, por lo que también son considerados potenciales fuentes de infección (Becher *et al.*, 1997). Otras fuentes de infección son: semen y embriones contaminados, transmisión del virus por los trabajadores, equipos o otros fómites (Sandvik, 2004).

2.2.3. Formas de transmisión

2.2.3.1. Transmisión horizontal

La transmisión horizontal puede darse de manera directa o indirecta. La directa es a través de secreciones o excreciones de animales infectados, principalmente PI (Houe, 1995), especialmente el contacto nariz-nariz entre un animal PI y un animal susceptible es el modo más eficiente de transmisión en condiciones naturales (Niskanen y Lindberg, 2003). Además, los animales con infección aguda también pueden esparcir la infección durante una breve viremia (7-

10 días), pero su rol en el mantenimiento de la infección en el hato parece ser menos importante (Mainar-Jaime *et al.*, 2001).

La forma indirecta es a través de instrumentos de uso veterinario como el uso de agujas hipodérmicas, prácticas de manejo como la palpación rectal (guantes) y la acción de insectos hematófagos, minutos después de haber estado en contacto con animales PI (Niskanen y Lindberg, 2003; Morán *et al.*, 2006). Sin embargo, su importancia práctica aún no está determinada, ya que es un virus que se inactiva fácilmente. El VDVB es rápidamente inactivado por el calor, desecación, luz ultravioleta, detergentes, solventes orgánicos y pH de 5.7 a 9.3 (Lértora, 2003).

El semen fresco o criopreservado de toros PI o con infección aguda es una importante vía de transmisión horizontal (Houe, 1999; Lértora, 2003; Grooms, 2004). Los toros PI diseminan el virus en altas concentraciones por el semen durante toda su vida. En cambio, los toros con infección transitoria pueden transmitir el virus a través del semen, pero no son considerados de gran importancia como transmisores de la infección dado que el virus se encuentra en bajas concentraciones y durante un breve período (Morán *et al.*, 2006).

2.2.3.2. Transmisión vertical

La transmisión vertical es de una vaca PI a su descendencia o de una vaca sana susceptible que se infecta horizontalmente durante la preñez, ocasionando un conjunto de anomalías (Houe, 1995); y si el feto es infectado por biotipos NCP antes de adquirir competencia inmunológica (antes del día 125 de gestación) desarrollará una infección persistente. A pesar de la elevada tasa de mortalidad de los animales PI en su primer año de vida (50%), muchos alcanzan la madurez sexual y se reproducen, además hembras PI siempre dan terneros PI (Lértora, 2003).

De otro lado, también la transferencia de embriones puede ocasionar una transmisión vertical, ya que si la hembra donante es PI, y no existe un adecuado

lavado de los embriones, puede transmitir la infección a la receptora, y esta última transmitirla al embrión trasplantado (Houe, 1999; Lértora, 2003).

2.3. PATOGENIA Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS

El VDVB es responsable de originar un amplio rango de manifestaciones clínicas y lesiones como resultado de la interacción de factores tales como: cepa y biotipo viral, edad, y estado inmune del hospedador, respuesta inmune inducida, factores estresantes y otros patógenos concurrentes (Lértora, 2003).

Los síntomas involucran a los sistemas respiratorio y gastrointestinal, además del reproductivo, inmunitario y sistema nervioso central, siendo estos últimos los más importantes; todo esto conlleva a cuadros que van desde una infección subclínica a otra altamente fatal con mortalidad en animales adultos mayores al 50% (Ridpath, 2003), notándose entre los cuadros más claros a los siguientes:

2.3.1. Infecciones agudas

Cuando la enfermedad fue descrita por primera vez por investigadores de la Universidad de Cornell en 1946 (Bronwlie *et al.*, 1998; Goyal y Ridpath, 2005), la DVB fue caracterizada como una infección viral transmisible marcada por severa leucopenia, alta fiebre, depresión, diarrea, erosiones gastrointestinales y hemorragias (Ridpath *et al.*, 2006). Sin embargo, es aceptado que las infecciones agudas están ampliamente distribuidas y son usualmente ligeras o inaparentes (Bronwlie *et al.*, 1998).

La forma aguda se presenta en animales seronegativos, en especial animales entre 6 y 24 meses de edad y es causada en su mayoría por el VDVB-NCP. Puede afectar al sistema respiratorio y digestivo, resultado de la difusión activa del virus (Rondón, 2006). Las infecciones primarias o agudas del VDVB en el ganado juega

un importante rol como un agente inmunosupresor o como un potenciador para otras enfermedades (Campbell, 2004).

Las principales manifestaciones de las infecciones clínicas agudas por el VDVB son:

2.3.1.1. Infecciones subclínicas

La mayoría de bovinos cursa un tipo de infección inaparente a leve, que puede acompañarse de fiebre, leucopenia transitoria, disminución de producción láctea, descarga oculonasal (Brownlie, 1991), ocasionales erosiones y úlceras orales, diarrea leve, elevada morbilidad y baja mortalidad, denominándose en este caso diarrea viral aguda, y se desarrollan anticuerpos neutralizantes 14 a 28 días post-infección y consecuentemente la protección contra re-infecciones por cepas homólogas del virus es de por vida (Fredriksen *et al.*, 1999; Lértora, 2003). La prevalencia superior al 50% de DVB encontrado en bovinos aparentemente normales hacen pensar que esta forma es también predominante en el Perú (Rivera, 1993).

2.3.1.2. Complejo diarrea neonatal bovina

El ternero puede infectarse en la etapa perinatal, es decir en el último tercio de la gestación o después de nacer, desarrollando luego una severa enteritis a veces fatal. Los anticuerpos que el ternero recibe de la madre a través del calostro y leche se agotan entre los 105 a 230 días de edad (Rivera, 1993).

Los efectos inmunosupresivos de la infección aguda por el VDVB son responsables de la potenciación de una variedad de enteropatógenos en el ganado como *Salmonella sp.*, *Rotavirus*, *Coronavirus* y *Escherichia coli* (Campbell, 2004), que resultan en manifestaciones clínicas más severas (Lértora, 2003).

2.3.1.3. Infecciones respiratorias

La enfermedad respiratoria bovina es reportada como la más importante enfermedad del ganado de carne (Campbell, 2004). El VDVB origina una inmunosupresión sistémica y pulmonar, aumentando la patogenicidad de los restantes agentes respiratorios. Además, se ha demostrado que ciertos VDVB actúan como agentes primarios de neumonías (Lértora, 2003). Rondón (2006) menciona que el subtipo Id del genotipo 1 del VDVB induce una enfermedad respiratoria primaria.

El VDVB es el virus más frecuentemente hallado en brotes de enfermedades respiratorias agudas en bovinos y generalmente es hallado asociado a *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, virus del Herpes Bovino 1 (IBR), *Mycoplasma bovis* (Campbell, 2004), Parainfluenza tipo 3 (Fulton *et al.*, 2000), y el virus sincitial respiratorio bovino (BRSV) (Bolin y Grooms, 2004).

2.3.1.4. Infecciones del tracto reproductivo

El mayor impacto económico de la infección con VDVB es el ocasionado por los trastornos reproductivos (Grooms, 2006). Tanto el biotipo CP como el biotipo NCP del VDVB pueden causar infección y pérdida del feto, pero sólo las infecciones transplacentarias con el biotipo NCP desarrollan inmunotolerancia en el feto y por tanto la persistencia viral (Brownlie, 1991).

El VDVB puede infectar células del ovario bovino y está asociado con ooforitis crónica seguida de una infección aguda (Grooms *et al.*, 1998). Este virus causa ooforitis intersticial no purulenta, con necrosis de células de la granulosa y de oocitos. Por lo que esta infección afectaría la función ovárica y reduciría la fertilidad de los bovinos (Lértora, 2003).

El impacto del VDVB durante la preñez se divide en cuatro períodos, en base a las manifestaciones clínicas de la infección considerando los siguientes intervalos de tiempo:

- Etapa embrionaria (0 - 45 días): Las infecciones de hembras susceptibles próximas al momento de la monta ocasiona muerte embrionaria y repeticiones de servicio hasta que desarrollen respuesta inmune. El virus no tiene efecto sobre el crecimiento y desarrollo de embriones hasta el día 8–9, momento en que pierden la zona pelúcida y se vuelven susceptibles (Grooms, 2004).
- Día 45 a 125 de gestación: Este período comienza al finalizar la etapa embrionaria y culmina cuando el feto adquiere competencia inmunológica al VDVB. Durante este período también se produce muerte fetal con momificación o aborto meses después y un pequeño porcentaje de teratogénesis (Lértora, 2003).
- Día 125 a 175 de gestación: Este período representa el comienzo de la inmunocompetencia fetal y del estado de organogénesis, por lo que se produce un alto porcentaje de alteraciones del desarrollo (Lértora, 2003). También se pueden producir abortos, pero estos son más comunes en etapas tempranas de la gestación. Se pueden observar distintos tipos y grados de anomalías congénitas tales como hipoplasia cerebelar, microencefalia, hipomielogénesis, hidrocefalia, atrofia o hipoplasia del timo, cataratas, microftalmia, hipoplasia pulmonar, braquigtanismo, artrogriposis, retraso general del crecimiento y deformidades esqueléticas (Grooms 2004, 2006).
- 175 días de gestación en adelante: Las infecciones con el VDVB en el último período de la gestación pueden resultar en el nacimiento de terneros normales o débiles, pero seropositivos al VDVB (Fredriksen *et al.*, 1999), mientras que los abortos son ocasionales (Lértora, 2003).

2.3.1.5 Inmunosupresión

El VDVB ocasiona leucopenia y altera las funciones de los leucocitos, aumentando la patogenicidad de microorganismos coinfectantes. Tiene una fuerte afinidad por el tejido linforeticular, ocasionando necrosis y atrofia de dichos tejidos. En el tejido linfoide el virus se localiza principalmente en las células del estroma, incluyendo macrófagos y células de soporte. Estas células elaboran citoquinas esenciales para el normal desarrollo y maduración de linfocitos, lo que sugiere que la necrosis linfoide es secundaria al trastorno del microambiente que proveen las células intersticiales y no a la acción directa del virus sobre los linfocitos (Lértora, 2003).

En los animales jóvenes la inmunosupresión asociada con la infección, puede llevar a la manifestación de problemas ocasionados por infecciones respiratorias e intestinales oportunistas (Peterhans *et al.*, 2003).

2.3.1.6. Síndrome hemorrágico o infección aguda severa

Los casos de infección aguda severa por VDVB han sido reportados con una alta frecuencia en Norteamérica a principios de la década de los noventa. El síndrome hemorrágico ha sido asociado con infecciones por el genotipo 2 del VDVB-NCP (Ridpath *et al.*, 2006).

Los signos clínicos incluyen alta fiebre, diarreas sanguinolentas (Ridpath *et al.*, 2006), depresión, anorexia, pirexia, disminución de la producción láctea y ulceraciones; llegando a una morbilidad del 40% y mortalidad a más del 10% (Ridpath *et al.*, 2000). También, una trombocitopenia ha sido descrita por varios autores en una infección aguda por VDVB (Campbell, 2004), debido a la infección de la médula ósea por el VDVB (Goyal y Ridpath, 2005).

2.3.2. Infección persistente

La infección fetal con VDVB puede resultar en el nacimiento de ganado inmunotolerante a DVB con una infección persistente inaparente. Los animales PI resultan por la infección fetal con VDVB-NCP durante el primer trimestre de gestación dado que el sistema inmune fetal infectado con VDVB-NCP antes del día 125 de preñez, no reconoce el VDVB como agente infeccioso o foráneo (Rondón, 2006). Las proteínas virales son reconocidas como antígenos propios con una resultante selección negativa de VDVB específica de linfocitos B y T durante su ontogenia (Grooms, 2004).

La apariencia clínica puede variar de normal a extremadamente anormal. La patología del ternero extremadamente anormal refleja el tropismo viral en el sistema nervioso central (SNC), células linfoides y epiteliales. En el SNC, los sitios predilectos de persistencia viral son la corteza cerebral y el hipocampo. En el tejido linfoide, existe una reducción en la recirculación de las células B, T y $\gamma\delta$. Finalmente, antígeno del VDVB puede ser demostrado en los queratinocitos de la lengua, piel y labios y esto podría explicar las lesiones erosivas orales características de la enfermedad clínica (Brownlie *et al.*, 1998).

La amplia distribución del VDVB en tejidos de animales PI podría ser la explicación del porque algunos animales eliminan grandes cantidades de virus por las secreciones oro-nasales, lágrimas, orina, leche, semen y probablemente piel (Chacón *et al.*, 2003).

2.3.3. Enfermedad de las mucosas (EM)

La EM requiere una infección persistente congénita con virus biotipo NCP y una subsecuente superinfección con virus biotipo CP (Sentsui *et al.*, 2001). En bovinos la EM se genera cuando animales PI con una cepa NCP son superinfectados con una cepa CP de origen exógeno o generado de cambios

genéticos o recombinación del ARN de las cepas NCP residentes, principalmente por inserción de secuencias celulares o re-arreglos genómicos, esto suele ocurrir entre los 6 a 24 meses de edad (Rondón, 2006).

No cualquier combinación de cepas VDVB-CP y VDVB-NCP en un animal PI resulta en EM. Cuando el biotipo CP superinfectante comparte una estrecha homología con el virus NCP del animal PI, se producirá la EM aguda, de curso fatal; pero si el virus superinfectante es una cepa heteróloga, la enfermedad no se producirá, ocurriendo la seroconversión contra la nueva cepa infectante (Brownlie, 1991).

Las severas lesiones que causan muerte de animales son encontradas en membranas mucosas del tracto gastrointestinal, especialmente en sitios con tejido linfoide asociado a intestino (Placas de Peyer). La examinación histológica confirma una ulceración extensiva y necrosis epitelial; y masiva destrucción de tejido linfoide en el intestino (Sentsui *et al.*, 2001).

2.4. RESPUESTA INMUNITARIA EN LAS INFECCIONES POR VDVB

El VDVB utiliza dos estrategias para permanecer en sus hospederos (Brackenbury *et al.*, 2003; Peterhans *et al.*, 2003; Rivera, 2008), la primera conocida como “choque y fuga” donde el virus establece infecciones transitorias de corta duración y rápida diseminación (Peterhans *et al.*, 2003; Rivera, 2008); y la segunda conocida como “infecta y persiste” (Peterhans *et al.*, 2003) donde se producen infecciones prolongadas con persistencia en las que el virus posee todo un mecanismo de evasión inmunitaria (inmunotolerancia específica) (Rivera, 2008). Además, las infecciones transitorias (agudas) producen una respuesta humoral que puede durar por toda la vida del animal, y las infecciones persistente (animales PI), aún cuando pueden responder ante otros agresores, se crea tolerancia al virus invasor específico (Peterhans *et al.*, 2003).

Las infecciones por el VDVB pueden resultar en inmunosupresiones, incrementando la susceptibilidad del hospedero a otros patógenos, y estimulando la patogenicidad de patógenos co-infectantes (Potgieter, 1995). Además, la habilidad de cruzar la placenta de animales preñados susceptibles y causar una variedad de infecciones fetales es la más importante evidencia del éxito del VDVB en la evasión del sistema inmune del hospedero (Chase *et al.*, 2004).

El VDVB infecta células del sistema inmune innato afectando la función de los neutrófilos, monocitos, macrófagos y células dendríticas. La infección de macrófagos con el biotipo CP o NCP conduce a una disminución en la formación del anión super-óxido y la producción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en una respuesta a LPS. También, la infección de macrófagos induce otros efectos inmunosupresivos como la estimulación de síntesis de prostaglandina E₂, inducción de inhibidores de IL-1, y una disminución de la quimiotaxis inducida por citoquina (Chase *et al.*, 2004).

La capacidad del VDVB-NCP para causar inmunotolerancia puede estar relacionada al tropismo del virus por las células presentadoras de antígeno (APC) (Brackenbury *et al.*, 2003). Además, la inmunosupresión ha sido relacionada a la habilidad del VDVB-NCP de bloquear la inducción de interferones tipo I (INF- α/β) *in vitro* (Charleston *et al.*, 2002; Brackenbury *et al.*, 2003). Por lo que la falla del biotipo NCP para inducir INF- α/β podría haber evolucionado para permitir al virus establecer una infección persistente en fetos tempranos (Charleston *et al.*, 2001; Brackenbury *et al.*, 2003; Peterhans *et al.*, 2003).

Otros posibles mecanismos objetivos del biotipo NCP podrían incluir la proteína quinasa R, una enzima clave de la vía del factor nuclear kappa B (NF- κ B) para la activación del gen y los factores reguladores de interferón (IRF) 3 y 7, los cuales están envueltos en la activación transcripcional de los genes del INF- β (Peterhans *et al.*, 2003; Shoemaker *et al.*, 2009).

Dadas las propiedades antivirales del INF- α/β y la evidencia que tiene un rol en promover las respuestas Th1 de células T, la inhibición de la inducción del INF- α/β por el biotipo NCP claramente tiene el potencial para alterar las respuestas inmunes y por lo tanto contribuir a la susceptibilidad incrementada a infecciones concurrentes (Charleston *et al.*, 2002).

Por otro lado, la falla del VDVB-NCP para establecer infección persistente en el embrión durante los primeros 40 días de desarrollo intrauterino podría ser debido al INF- τ , el cual es producido en concentraciones muy altas por el trofoblasto bovino durante el estado más temprano de gestación. El INF- τ tiene actividad antiviral similar a otros interferones tipo I, por lo que actuaría previniendo la infección del embrión (Peterhans *et al.*, 2003).

El VDVB-CP induce la producción de INF- α , el cual elimina las células infectadas con virus a través de la apoptosis (Chase *et al.*, 2004). El biotipo CP induce apoptosis a través de la vía de activación de caspasa, también mediante el estrés oxidativo, acumulación intracelular del ARN viral, caspasa 12 asociado al estrés del retículo endoplasmático y activación de caspasa 9 dependiente de mitocondria (St-Louis *et al.*, 2005). *In vitro*, el biotipo NCP produce INF- α pero en menor cantidad que el CP (Chase *et al.*, 2004). Además, el NCP también inhibe la apoptosis inducida por ARN de doble cadena (dsRNA) (Peterhans *et al.*, 2003) y la síntesis de interferón por inhibición de la síntesis ARN mensajero (ARNm) del INF- α/β (Chase *et al.*, 2004).

La diferencia en la capacidad de los dos biotipos para estimular la respuesta inmune innata está influenciando el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa. *In vivo*, la infección con el biotipo NCP resulta en altos y prolongados niveles de INF- α/β detectables en el suero, mientras el INF- α/β no es detectable después de la infección con el biotipo CP. Por otra parte, estudios *in vitro* con el virus CP sugieren que el virus no mata células dendríticas (CD), permitiendo que estas células migren

e inicien una respuesta inmune en los nódulos linfáticos locales (Brackenbury *et al.*, 2003).

Además, el biotipo NCP podría no estimular una respuesta inmune innata en la superficie de la mucosa después de un desafío intranasal. Porque la inmunidad innata no es estimulada en el sitio local, las CD no se activarán y no restringirá el crecimiento viral. Sin embargo, cuando el virus libre entra al nódulo linfático, la interacción con las CD plasmocitoides resultaría en la inducción de INF- α . Las CD plasmocitoides son conocidas como las células productoras de interferón natural, las cuales son un tipo celular clave entre la conexión de la respuesta inmune innata y la adaptativa (Brackenbury *et al.*, 2003).

Existe un mayor rol de las células CD4⁺, pero no de las células CD8⁺, lo cual indica actividad de las células T citotóxicas (Potgieter, 1995). Además, Lambot *et al.* (1997) sugieren que las células CD4⁺ juegan un rol crucial en el establecimiento de la memoria inmune al VDVB. *In vivo*, la depleción de las células T CD4⁺ pero no las células T CD8⁺ ni $\gamma\delta$ ⁺ prolonga la duración de emisión nasal en bovinos infectados agudamente. Las proteínas que determinan la respuesta CD4⁺ son las de la envoltura E^{ms}/gp48 y E2/gp53, la no estructural NS2-3/p125, las C/p14 y N^{pro}/p20 (Collen y Morrison, 2000).

Collen y Morrison (2000) demostraron que las infecciones primarias con VDVB CP y NCP inducen fuertes respuestas célula T CD4⁺ que reconoce epítopes en un rango de proteínas virales estructurales y no estructurales incluyendo epítopes compartidos entre cepas de virus heterólogos. Debido a que la depleción de células CD4⁺ incrementa el período de emisión del virus, mientras que la depleción de las células T CD8⁺ y $\gamma\delta$ no tenían efecto en el período de emisión del virus, demostrando la importancia del fenotipo de ayuda CD4 en la inmunidad del VDVB (Chase *et al.*, 2004).

Los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ tienen un rol en la respuesta inmune en las infecciones agudas del VDVB (Chase *et al.*, 2004). La proliferación de células CD8⁺ producen IL-2 e INF- γ indicando una respuesta de memoria tipo I en el ganado seropositivo a VDVB (Rhodes *et al.* 1999; Chase *et al.*, 2004).

Los terneros que tienen anticuerpos calostrales circulantes contra el VDVB, que se exponen a vacunas de virus vivo modificado o a infecciones naturales, producen respuestas celulares tipo T cooperadoras CD4⁺, T citotóxica CD8⁺, T $\gamma\delta$ ⁺ (Endsley *et al.*, 2004) y células B de memoria, todo esto en ausencia de una respuesta humoral. Estos animales al hacerse seronegativos pueden ser resistentes a la infección aguda por VDVB mediante la respuesta celular (Endsley *et al.*, 2003).

Con respecto a la respuesta inmune humoral, Fredriksen *et al.* (1999) determinaron que animales inmunocompetentes seronegativos infectados experimentalmente y naturalmente con VDVB, seroconvertían 14 a 28 días después de la inoculación y que todos los animales seguían presentando altos niveles de anticuerpos hasta después de los 3 años post-infección.

2.5. DIAGNÓSTICO

Actualmente, los métodos disponibles para el diagnóstico de infecciones agudas o persistentes del VDVB incluyen la inmunohistoquímica, ELISA para la detección de anticuerpos y captura de antígenos, pruebas de RT-PCR, el aislamiento viral (Fulton *et al.*, 2000; Baxi *et al.*, 2006; Houe *et al.*, 2006; Edmondson *et al.*, 2007; Hilbe *et al.*, 2007), la prueba de virus neutralización (Fulton *et al.*, 1997; Saliki y Dubovi, 2004; Houe *et al.*, 2006), entre otras.

2.5.1. Aislamiento en cultivo celular

A pesar de los recientes avances de la ciencia del diagnóstico del VDVB, el cultivo y la identificación del VDVB es considerada como la técnica diagnóstica “estándar de oro”. El virus fácilmente crece en muchas líneas celulares de varias especies animales; sin embargo, solamente tres líneas celulares son ampliamente usadas en los laboratorios de diagnóstico para el aislamiento del VDVB: Cornete Nasal Bovino (NSB), Testículo Bovino (TB) y Riñón Bovino Madin Darby (MDBK) (Saliki y Dubovi, 2004).

En el animal vivo, la mejor muestra para el aislamiento del VDVB es la sangre total, de la cual las células de la sangre blanca son extraídas y usadas como el inóculo. Las mejores muestras de necropsia y fetos abortados son los órganos linfoides como el bazo, las placas de Peyer del intestino delgado, nódulos linfáticos mesentéricos y el timo (Saliki y Dubovi, 2004). El aislamiento viral tiene una sensibilidad de 83% y una especificidad de 100% (Rivera, 2008).

Debido a que los dos biotipos del VDVB (NCP y CP) pueden dar lugar a los mismos signos clínicos, se podría aislar cualquiera de los dos biotipos. Si el biotipo es CP (menos común) se observa el efecto citopático; si se trata del biotipo NCP (el más común en el campo) no se produce ninguna lesión citopática, por lo tanto es necesario una prueba adicional, como la inmunofluorescencia o la inmunoperoxidasa (Rivera, 1993).

2.5.2. Detección de antígenos virales

La detección del antígeno del VDVB de muestras sospechosas es mucho más rápida y de menor costo que el aislamiento viral. Para el diagnóstico de infecciones agudas, los métodos de detección de antígeno deberían ser normalmente usados como métodos exploratorios (Saliki y Dubovi, 2004). Las técnicas más usadas son inmunofluorescencia (IF) en tejido fresco e inmunoperoxidasa (IP) en tejido fresco o

fijado en formalina utilizando anticuerpos monoclonales (mAbs) (Brodersen, 2004; Rivera, 2008).

2.5.2.1. Inmunofluorescencia (IF)

Es una prueba inmunohistoquímica, muy utilizada en los laboratorios de diagnóstico como una prueba tamiz, la cual se usa para la detección de antígeno en los tejidos frescos usando para esto anticuerpos monoclonales o policlonales contra el VDVB marcados con una sustancia fluorescente (fluorocromos o conjugados) (Benito *et al.*, 2001). Los anticuerpos policlonales son muy reactivos, sin embargo podrían producir coloraciones inespecíficas, dificultando la lectura y dando un resultado de un falso positivo. En cambio, los anticuerpos monoclonales producen una coloración más clara, de fácil lectura, pero teniendo cuidado que sean reactivos contra todos los VDVB, para evitar falsos negativos (Saliki y Dubovi, 2004). La IF requiere de un microscopio de fluorescencia para observar el antígeno (Benito *et al.*, 2001). La IF tiene una sensibilidad de 77% y una especificidad de 88% (Rivera, 2008).

2.5.2.2. Inmunoperoxidasa (IP)

Es una prueba inmunohistoquímica usada para la detección de antígeno del VDVB en tejidos frescos o fijados en formalina (Rivera, 2008). Se utiliza para esta prueba un anticuerpo monoclonal o policlonal marcado con una enzima llamada peroxidasa (Benito *et al.*, 2001). Para animales PI puede usarse cualquier tipo de tejido, sin embargo se ha observado un mayor éxito utilizando los nódulos linfáticos, glándula tiroides, piel, cerebro, abomaso y placenta (Bolin y Grooms, 2004). La sensibilidad y especificidad de la prueba IP es de 97% para ambos casos (Rivera, 2008).

Una prueba inmunohistoquímica para la determinación del VDVB de biopsias de piel ha sido implementada para poder diferenciar entre animales PI y animales

con infecciones agudas (Brodersen, 2004; OIE, 2004; Houe *et al.*, 2006). Esta prueba se está utilizando como prueba tamiz (Brodersen, 2004).

2.5.2.3. ELISA de captura de antígenos

Esta técnica es muy útil para detectar antígeno viral en muestras de sangre con anticoagulante, en la capa leucocitaria (buffy coat), en suero o plasma o de tejidos en suspensión (Benito *et al.*, 2001). La mayoría de métodos están basados en el principio del ELISA tipo sándwich, con un anticuerpo de captura ligado a la fase sólida, y un detector de anticuerpo conjugado a un sistema de señal, tal como la peroxidasa (OIE, 2004). Esta prueba permite estudiar numerosas muestras simultáneamente y tiene una sensibilidad y especificidad diagnóstica de 97 y 99% respectivamente. Se debe tener presente que existen muchas cepas de campo del VDVB por lo que el anticuerpo monoclonal utilizado para detectar si no a todas las cepas de virus, al menos la mayoría de las cepas, debe ser dirigido contra la proteína estable del virus, la proteína estructural NS2-3/NS3. Esta prueba es adecuada para la detección de animales PI (OIE, 2004); y también en casos agudos de DVB (Benito *et al.*, 2001).

2.5.3. Detección de anticuerpos

La medición de la respuesta de anticuerpos de animales expuestos a un agente infeccioso a través de una exposición natural o mediante un protocolo de inmunización es todavía un procedimiento estándar. Para el VDVB, los formatos de pruebas han sido grandemente limitados a las pruebas de Neutralización Viral (NV) y ELISA (Saliki y Dubovi, 2004). La detección de anticuerpos es el método diagnóstico más común, aunque de menor utilidad en hatos o en zonas donde se usa la vacunación contra el VDVB (Rivera, 2008).

2.5.3.1. Neutralización Viral (NV)

La NV es la técnica estándar para la detección de anticuerpos neutralizantes o protectores inducidos por la E2/gp53 del VDVB de campo o por el virus vacunal y su función es remover al virus de la circulación y proteger al animal contra futuras infecciones con cepas del mismo tipo. La muestra requerida para esta prueba es el suero y/o fluido torácico fetal pero no plasma. Actualmente la prueba es realizada en microplacas de 96 hoyos y requiere de una cepa CP del VDVB que debe ser mantenida en el laboratorio debidamente titulada en cultivo celular secundario o línea celular continua libre de VDVB endógeno y la lectura se hace al tercer o cuarto día (Benito *et al.*, 2001).

Esta técnica es cualitativa y permite detectar y titular anticuerpos (Houe *et al.*, 2006). La titulación de anticuerpos es de gran utilidad, ya que permite evaluar la respuesta inmune luego de una vacunación. El título neutralizante de suero es la recíproca dilución de suero, expresado en Log, capaz de proteger una monocapa celular de por lo menos 1000 DL50 del virus (Saliki y Dubovi, 2004). Además, el método de virus neutralización es muy específico y sensible (Rivera, 1993).

2.5.3.2. Ensayo de Inmunoabsorbancia Ligada a Enzimas (ELISA)

Son técnicas de diagnóstico muy versátiles que pueden trabajar numerosas muestras simultáneamente y tienen alta sensibilidad y especificidad por lo que son utilizados en estudios epidemiológicos en gran escala como pruebas de tamiz. Las muestras requeridas para esta prueba son: suero, plasma y leche descremada. Estas pruebas pueden ser básicamente de dos tipos: ELISA indirecta en el cual el antígeno está inmovilizado en un sustrato y se usa para atrapar el anticuerpo presente en la muestra formando un complejo que es detectado por la adición de un conjugado marcado con una enzima y un sustrato cromógeno; y la ELISA de competencia donde el anticuerpo virus específico sin marcar presente en la muestra, compite o bloquea la unión por el antígeno con anticuerpos monoclonales

específicos marcados con una enzima, resultando en una ausencia o baja señal (cambio de coloración) para la muestra positiva (Benito *et al.*, 2001).

2.5.3.3. Serología en leche

La prueba de leche en tanque para la detección de anticuerpos contra el VDVB es un método rápido, no invasivo y de costo efectivo. Para ello se han desarrollado kits de ELISA indirecto (Ståhl *et al.*, 2002). Este método puede ser usado como un primer paso en una estrategia de control para discriminar entre los hatos posiblemente infectados y no infectados (Houe *et al.*, 2006), dando una medición cualitativa del estatus de infección en el hato. Además, para infecciones endémicas como el VDVB existe también una correlación entre el nivel de anticuerpos en una muestra de leche en tanque con las vacas positivas (prevalencia de anticuerpos en el hato). La sensibilidad y especificidad corregida para este ELISA indirecto en pools de leche obtenidas a partir de un estudio fueron 96 y 97%, respectivamente (Ståhl *et al.*, 2002).

2.5.4. Detección del ácido nucleico viral

Las técnicas moleculares están siendo aplicadas para el estudio del VDVB como la transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) usando iniciadores específicos de la región 5'UTR y la región que codifica la proteína no estructural NS3 del genoma viral. Es útil para detectar virus en animales PI pero también para monitorear virus en suero fetal utilizado para cultivos celulares (Benito *et al.*, 2001).

La fortaleza del PCR es su elevada sensibilidad pero es afectada por su vulnerabilidad (Rivera, 2008). La técnica del RT-PCR en tiempo real viene siendo utilizada por su rapidez y precisión (Baxi *et al.*, 2006); y tiene la ventaja de realizarse en un sistema cerrado evitándose la contaminación entre las muestras y no requiere del análisis por electroforesis del producto post PCR (Mahlum *et al.*, 2002; Rivera,

2008). Además, Baxi *et al.* (2006) han desarrollado RT-PCR múltiple de un paso en tiempo real para el diagnóstico del VDVB, el cual es rápido, altamente sensible y específico; y por lo tanto parece ser útil para la clasificación viral en investigación o para la aplicación en el diagnóstico.

Actualmente, la tecnología de la proteómica viene representando un enorme potencial con fines de diagnóstico veterinario, como es el caso del “microarray” que primeramente fue usado para el mapeo de genes (Bollo, 2007; Rivera, 2008), pero que recientemente es utilizado para identificar agentes con alta variabilidad genética como el VDVB (Rivera, 2008).

2.6. PREVENCIÓN Y CONTROL

Desde hace varios años, muchos países europeos han implementado estrategias para el control de la infección por el VDVB, tales como Italia, Suecia, Países Bajos, Alemania, Austria (Ferrari *et al.*, 1999; Hult y Lindberg, 2005; Mars y Van Maanen, 2005; Moennig *et al.*, 2005; Rossmanith *et al.*, 2005), entre otras muchas regiones de Europa.

Las explotaciones no infectadas, sin animales seropositivos, lo más importante es evitar el ingreso del virus a través de un estricto programa de bioseguridad, mientras que en condiciones de alto riesgo podría recurrirse a la vacunación (Van Oirschot *et al.*, 1999). Por otro lado, en las explotaciones infectadas el primer objetivo es la identificación y remoción de los animales PI (Ferrari *et al.*, 1999).

Ferrari *et al.* (1999) recomiendan que antes de aplicar un programa de vacunación, el estatus del hato para VDVB tiene que ser claramente definido y con la base de esta información, un apropiado programa de vacunación deberá ser diseñado. En hatos infectados con una alta seroprevalencia, una vacunación extensa es considerada innecesaria y cara. Por lo que, en este caso se recomienda

la vacunación de los animales seronegativos de reposición antes del servicio, evitando el uso indiscriminado de la vacuna.

Una medida crítica en el control del VDVB es cambiar los patrones de comercio y prevenir los animales PI de ser colados en el mercado. Una herramienta poderosa para lograr esto es sensibilizar a los comerciantes de ganado que demanden animales evaluados para DVB informando a los criadores acerca de la DVB y la importancia de pedir el estatus de DVB de los animales que ellos compran (Hult y Lindberg, 2005).

Por lo antes mencionado, la implementación de programas de control en nuestro país debe incluir medidas de bioseguridad adecuadas, la detección y remoción de animales PI, métodos de diagnóstico estandarizados, evaluación periódica del estatus de los hatos y finalmente la concientización de los criadores y capacitación de veterinarios y demás profesionales sobre la DVB.

2.6.1. Implementación de medidas de bioseguridad

La bioseguridad en el manejo de los programas de control están dirigidos a cómo evitar las re-infecciones en la población bovina en evaluación (Sandvik, 2004). Por lo tanto se debe establecer un control estricto de los animales nuevos que ingresen al hato, deben ser seronegativos al virus antes y después de un período de cuarentena (Sandvik, 2004) de 30 días (Brock, 2004), también se recomienda rechazar la compra de animales preñados serológicamente positivos a anticuerpos contra el VDVB (Ferrari *et al.*, 1999).

Es necesario evitar el contacto de los animales con crías vecinas y con otras especies que puedan actuar como reservorios del VDVB. Además, se debe tener cuidado con el uso de productos biológicos como semen, embriones y calostro sin certificación de animales libres del VDVB. Al mismo tiempo, es necesario desinfectar adecuadamente materiales y vestimenta de trabajo de profesionales y

otros visitantes que hayan tenido contacto con otros establos. Por último, se debe limitar al máximo el movimiento de animales dentro y fuera del establo, en especial las hembras gestantes (Brock, 2004; Sandvick, 2004) y evaluar las medidas de bioseguridad por pruebas serológicas periódicas asegurando que el VDVB no está siendo introducido (Brock, 2004).

2.6.2. Identificación y eliminación de animales persistentemente infectados (PI)

Los animales PI constituyen la fuente más importante de infección viral por lo que su detección temprana y eliminación es el punto primario de la prevención y control del VDVB (Ferrari *et al.*, 1999; Brock 2003, 2004).

La presencia de animales PI en hatos bovinos en nuestro país ha sido reportado por varios estudios (Chacón *et al.*, 2003; Morales *et al.*, 2003; Rivera *et al.*, 2003; Jayashi *et al.*, 2005; Zúñiga *et al.*, 2006, Huamán *et al.*, 2007). Estos estudios demuestran que la infección con VDVB es altamente prevalente en hatos que tienen animales PI.

La erradicación del VDVB por eliminación de los animales PI, sin el uso de vacunas, ha sido muy efectiva en Europa, siguiendo siempre estrictas medidas de bioseguridad y análisis de laboratorio (Sandvik, 2004).

2.6.3. Vacunación

A partir de la década del 60, el control de la DVB estaba focalizado en prevenir la ocurrencia clínica de la enfermedad mediante la vacunación (Rivera, 2008). Las vacunas comerciales contra el VDVB son ampliamente usadas en muchas partes del mundo. Ambas vacunas inactivadas y vivas modificadas están disponibles (Zimmer *et al.*, 2002).

A la fecha se han fabricado más de 150 vacunas comerciales a virus vivo modificado o a virus inactivado; sin embargo, su uso masivo en algunos países por más de cuatro décadas, no ha logrado la reducción de la prevalencia e incidencia de la DVB (Rivera, 2008).

Es generalmente aceptado que las vacunas vivas modificadas inducen una sólida inmunidad, pero cuando son usadas durante la preñez, podría inducir el nacimiento de terneros PI (Zimmer *et al.*, 2002). Por otro lado, las vacunas inactivadas son seguras y pueden ser administradas en cualquier etapa de la gestación, la revacunación es requerida (Moennig *et al.*, 2005).

Van Oirschot *et al.* (1999) consideran la necesidad de estudios adicionales sobre la eficacia y seguridad de las vacunas, sobre todo, considerando la diversidad antigénica de las cepas del VDVB de campo. Kóvacs *et al.* (2003) mencionan que hay varios estudios que han evaluado la habilidad de las vacunas para proteger a los fetos contra las infecciones intrauterinas. Algunas vacunas de virus inactivado no proveyeron una adecuada protección fetal. Sin embargo, reportan que otros estudios encontraron niveles de protección más altos usando dos o tres dosis de una vacuna inactivada.

En Alemania se ha implementado un programa de vacunación a dos pasos. Se utiliza una vacuna inactivada para la primera inmunización y cuatro semanas después una vacuna a virus vivo modificado. Esta primera vacunación con la vacuna inactivada reduce o incluso previene la viremia después de la vacunación de refuerzo usando la vacuna atenuada, por lo tanto reduciendo o previniendo la emisión de virus vacunal. Este sistema ha producido una respuesta inmune prolongada y protección fetal contra el desafío de VDVB a partir del quinto mes luego de la vacunación (Moennig *et al.*, 2005).

En el Perú no existe un programa de control de la DVB. Algunos ganaderos de las principales cuencas lecheras utilizan la vacunación. Las vacunas autorizadas

oficialmente son de tipo inactivado y su uso es voluntario y profiláctico más que de control sistemático (Rivera, 2008). El rol de las vacunas puede ser útil solo cuando se aplica en forma estratégica y sistemática, es decir, como una medida de bioseguridad, cuyo efecto debería ser evaluado contra el costo, la seguridad y la eficacia (Lindberg *et al.*, 2006) y a la vez conjuntamente con la detección de animales PI y vigilancia permanente (Rivera, 2008).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE ESTUDIO

El estudio se realizó en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología, Sección Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria (FMV) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). Las muestras del estudio fueron obtenidas mediante la colaboración del Programa de Desarrollo Ganadero (PRODEGAN) en la provincia de San Pablo, departamento de Cajamarca en el año 2004. La provincia de San Pablo se encuentra localizada a una altitud de 2,441 msnm y a 108 Km de la capital de Cajamarca.

3.2. MATERIALES

3.2.1. Muestras

Las muestras procedentes de la provincia de San Pablo fueron obtenidas del banco de sueros almacenados a -20°C en el Laboratorio de Virología FMV – UNMSM.

3.2.2. Equipos

Se utilizaron una congeladora de -20°C (Revco), una cabina de flujo laminar Tipo II (Steril Gardhood, USA), una estufa de CO₂ de 5% a 37°C (Mettler, Alemania), un microscopio de luz simple invertido (Leitz Wetzlar, Alemania), un baño maría (Precision Scientific, USA), frascos de cultivo celular descartables de 25 cm² y 75 cm², microplacas para cultivo celular con 96 pocillos, micropipetas simples y multicanales de 5 a 50 µl y de 200 a 1000 µl, viales y tips descartables.

3.2.3. Reactivos y cultivos celulares

Como sistema indicador de la prueba de neutralización viral se utilizó cultivos primarios de células de cornete nasal de feto bovino (CNB) normal preparado en el Laboratorio de Virología de la FMV – UNMSM. Las células fueron cultivadas empleando medios de cultivo Eagle Minimal Essential Medium (MEM) y Leibowitz (L-15) (Sigma, USA), en una proporción 50:50 suplementadas con el 10% de suero fetal bovino libre de VDVB (Sigma, USA), antibióticos (Penicilina y Estreptomicina), antimicóticos (Fungizona), tripsina (Versene) y suero fisiológico.

3.2.4. Cepa del VDVB

La cepa del virus utilizado fue la cepa Singer prototipo del biotipo citopático (CP), genotipo I del virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) (Ames, USA) con título de 10⁻⁵ DI₅₀CC/50 µl.

3.3. MÉTODOS

3.3.1. Tamaño muestral

El tamaño de muestra se obtuvo mediante la fórmula para poblaciones infinitas, tomándose como referencia una prevalencia de 49.3% (Rivera, datos no publicados), con un nivel de confianza de 95% y un error del 5%, mediante la siguiente fórmula (Daniel, 1996):

$$n = \frac{Z^2 pq}{e^2}$$

Donde:

n = tamaño mínimo de muestra

Z = nivel de confianza al 95% (1.96)

p = proporción de animales infectados (49.3%; Rivera datos no publicados)

q = **(1-p)** = proporción de animales no infectados (50.7%)

e = precisión (5%)

El tamaño mínimo de muestras obtenido fue de 385.

Cuadro 1. Distribución de los bovinos muestreados en la provincia de San Pablo, departamento de Cajamarca

SEXO/EDAD	0 - <6 meses	≥6 - <12 meses	≥12 meses	TOTAL
Machos	16	31	53	100
Hembras	16	36	233	285
TOTAL	32	67	286	385

3.3.2. Detección de anticuerpos en suero sanguíneo por neutralización viral

Las muestras fueron conservadas en congelación a -20°C hasta la fecha de procesamiento. La neutralización viral se realizó en placas descartables de 96 hoyos, según la técnica descrita por la OIE (2004) que se encuentra disponible en el Laboratorio de Virología de la FMV – UNMSM.

La prueba se realizó de la siguiente manera:

- Los sueros fueron inactivados a 56°C por 30 minutos en baño maría.
- Se colocó 50 µl de diluyente (MEM + antibiótico) en una microplaca de 96 hoyos para cultivo celular.
- Se añadió 50 µl de suero en la primera hilera de la microplaca.
- Con una micropipeta multicanal se realizó diluciones dobles, empezando por 1:2 hasta 1:256, eliminándose de esta última hilera 50 µl de la mezcla suero-diluyente.
- Se añadió a toda la microplaca 50 µl de (VDVB) conteniendo 100 DI₅₀CC/50 µl.
- En otra placa se realizó los controles de 1, 10 y 100 dosis infectivas del virus y de las células CNB utilizadas.
- Se incubó, incluyendo la placa control, en estufa a 37°C por una hora.
- Cumplido ese tiempo se añadió a toda la microplaca incluyendo los controles, 100 µl de una suspensión de células de CNB (3×10^3 / hoyo) y se incubó en estufa a 37°C y 5% de CO₂ por 4 días luego del cual se hizo la lectura.

3.3.2.1. Lectura

El título del suero fue la dilución más alta capaz de neutralizar las 100 DI₅₀CC/50 µl del virus, evidenciado por la ausencia del efecto citopático de los virus sobre las células indicadoras (empezando de la dilución menor a la dilución

mayor). Los sueros con títulos iguales o mayores a 1:2 fueron considerados positivos a anticuerpos contra el VDVB.

3.3.3. Análisis de los datos

3.3.3.1. Prevalencia a la prueba

La prevalencia de la diarrea viral bovina (DVB) fue determinada haciendo uso de la siguiente fórmula (Thrusfield, 1990; Goyal y Ridpath, 2005):

$$PREVALENCIA = \frac{\text{Número de muestras positivas}}{\text{Total de muestras}} \times 100$$

3.3.3.2. Prevalencia corregida

Con la finalidad de determinar la prevalencia corregida (TP) de la DVB en el presente estudio se utilizó la siguiente fórmula estadística que corrige el valor obtenido (prevalencia aparente [AP]) tomando en cuenta la sensibilidad (Se) y especificidad (Sp) de la prueba que se utilizó para el diagnóstico, virus neutralización (NV) (Goyal y Ridpath, 2005):

$$TP = \frac{AP + Sp - 1}{Sp + Se - 1}$$

Donde:

TP = Prevalencia corregida

AP = Prevalencia aparente

Se = Sensibilidad = 99.6% (VanLeeuwen *et al.*, 2005)

Sp = Especificidad = 100% (VanLeeuwen *et al.*, 2005)

3.3.3.3. Intervalo de confianza

La prevalencia aparente y corregida son expresadas con su respectivo intervalo de confianza (IC) de 95%, según la siguiente fórmula (Daniel, 1994):

$$p \pm Z \sqrt{\frac{p \cdot q}{n}}$$

En donde:

p = prevalencia aparente y corregida

Z = 95% del nivel de confianza (1.96)

q = (1 – p)

n = número mínimo de muestras (385)

3.3.3.4. Prueba de Chi cuadrado

Esta prueba estadística no paramétrica se realizó para determinar si existía asociación entre las variables del estudio como los grupos etarios y el sexo frente la seropositividad contra el VDVB, utilizando un nivel de significación de 0.05. Por lo que se ingresaron los datos en el programa STATA 10®.

Para poder realizar este análisis se dividió a los animales en 3 grupos etarios: animales de 2 a menores a 6 meses (2 - <6), mayores e iguales a 6 a menores de 12 meses (≥6 - <12) y animales mayores e iguales a 12 meses (≥12).

3.3.3.5. Regresión Logística:

Se utilizó el modelo de regresión logística para determinar el efecto de las variables grupo etario, sexo y seropositividad contra el VDVB. Para tales fines se usó el programa STATA 10® para el análisis de datos, utilizando un nivel de significancia de 0.05.

IV. RESULTADOS

El $27.0 \pm 4.4\%$ (104/385) ($27.1 \pm 4.4\%$ de prevalencia corregida) de las muestras presentaron anticuerpos contra el VDVB. Animales seroreactores fueron detectados tanto en machos como en hembras (Cuadro 2). La seroprevalencia fue similar en los tres grupos etáreos (Cuadro 3). En el Cuadro 4 se presenta la distribución de los títulos de anticuerpos, donde se observa que el $60.3 \pm 9.4\%$ (50/83) de los animales mayores a 12 meses tuvieron títulos entre 128 a mayores a 256. Analizando los datos con la prueba del Chi Cuadrado no se encontró asociación estadística entre las variables sexo y grupo etario con respecto a la seropositividad contra el VDVB; así mismo utilizando la prueba de regresión logística se determinó que el sexo y los grupos etarios no representaron factores de riesgo para la seropositividad contra el VDVB (Cuadro 5).

Cuadro 2. Seroprevalencia corregida del virus de la diarrea viral bovina en la provincia de San Pablo, departamento de Cajamarca, según sexo

Sexo	Animales muestreados	Animales positivos	Prevalencia corregida \pm IC*
Machos	100	25	$25.1 \pm 4.3\%^a$
Hembras	285	79	$27.8 \pm 4.5\%^a$
Total	385	104	$27.1 \pm 4.4\%^a$

*IC: Intervalo de confianza al 95%

^aNo existe diferencia estadística ($p>0.05$)

Cuadro 3. Seroprevalencia corregida del virus de la diarrea viral bovina en la provincia de San Pablo, departamento de Cajamarca, según grupo etario

Edad	Animales muestreados	Animales positivos	Prevalencia corregida \pm IC*
2 - <6 meses	32	7	22.0 \pm 4.1% ^a
≥ 6 - <12 meses	67	14	21.0 \pm 4.0% ^a
≥ 12 meses	286	83	29.1 \pm 4.5% ^a
Total	385	104	27.1 \pm 4.4% ^a

*IC: Intervalo de confianza al 95%

^aNo existe diferencia estadística ($p > 0.05$)

Cuadro 4. Distribución de los títulos de anticuerpos contra el virus de la diarrea viral bovina detectados mediante la prueba de neutralización viral

Edad	Animales positivos	Inversa de títulos de anticuerpos					
		2 – 8	%	16 – 64	%	128 – >256	%
2 - <6 meses	7	0	0 \pm 6.4	4	57.1 \pm 9.5	3	42.9 \pm 9.5
≥ 6 - <12 meses	14	5	35.7 \pm 9.2	3	21.4 \pm 7.9	6	42.9 \pm 9.5
≥ 12 meses	83	8	9.6 \pm 5.7	25	30.1 \pm 8.8	50	60.3 \pm 9.4
Total	104	13		32		59	
%	100	12.5 \pm 6.4		30.8 \pm 8.9		56.7 \pm 9.5	

Cuadro 5. Determinación del riesgo de infección con el virus de la diarrea viral bovina en la población de bovinos estudiada según las variables sexo, grupo etario y seropositividad

Variable	Odds Ratio (OR)	IC* del OR	
		Límite inferior	Límite superior
Sexo	0.97	0.56	1.68 ^a
≥6 - <12 meses	0.94	0.34	2.62 ^a
≥12 meses	1.45	0.59	3.53 ^a

*IC: Intervalo de confianza al 95%

^aNo existe diferencia estadística ($p>0.05$)

V. DISCUSIÓN

El $27.1 \pm 4.4\%$ (104/385) de los animales muestreados presentó anticuerpos neutralizantes contra el VDVB, el cual es relativamente bajo comparado a los resultados de estudios realizados en otras zonas del país (Contreras *et al.*, 2000; Rivera *et al.*, 2001; Rivera *et al.*, 2003; Aguilar *et al.*, 2006; Cabello *et al.*, 2006; Zúñiga *et al.*, 2007; Huamán *et al.*, 2007; Quispe *et al.*, 2008).

Dentro del programa sanitario que utilizan los ganaderos de San Pablo no figura la vacunación contra la DVB como medida de prevención, por lo que los anticuerpos detectados no fueron de origen vacunal, sino, inducidos por el virus de campo. La prevalencia fue similar en machos y hembras y en los tres grupos etáreos, sugiriendo que la población bovina estuvo siendo recientemente desafiada por el virus. Si esta hipótesis es verdad sería una explicación de la baja prevalencia obtenida pero también podría deberse al sistema de crianza de tipo extensivo donde la infección no se difunde con la rapidez como ocurre en una crianza intensiva (Houe, 1995).

No se dispone de información respecto a cómo y cuándo ingresó el virus a la zona, pero como ha ocurrido en otros lugares del país, posiblemente el virus ingresó con la introducción de animales genéticamente mejorados procedentes de áreas como la campiña de Cajamarca donde la DVB está difundida o animales adquiridos en ferias sin un previo análisis, con fines de mejoramiento o incrementar su población (H. Rivera, Lima, comunicación personal).

Usualmente más del 70% de los animales inmunocompetentes infectados por el VDVB presentan una infección subclínica pero eliminan al virus a través de sus secreciones aunque por un corto período (Houe, 1995), pero los principales reservorios y diseminadores del virus son los animales portadores o persistentemente infectados (PI) por lo que la alta prevalencia del VDVB en una zona o hato está asociado a la presencia de animales PI (Houe, 1995; Houe, 2003).

El resultado del presente estudio podría sugerir la ausencia de animales PI como lo indica Mainar-Jaime *et al.* (2001) o que los animales PI nacen débiles y mueren poco después pero durante ese tiempo eliminan virus a través de secreción nasal, saliva, orina, heces, lágrimas, semen y leche (Betancur *et al.*, 2007), como también pueden llegar a la etapa reproductiva, por tanto no se debe descartar la presencia de estos animales en la zona. En el presente estudio no se detectó el virus en las muestras de suero.

La mayor prevalencia se detectó en bovinos mayores a 12 meses (Cuadro 3) indicando una relación directa entre la edad y la seropositividad. El presente resultado también es similar a lo obtenido por Ferrari *et al.* (1999) quienes detectaron una seroprevalencia del 31.4%, en animales mayores a 1 año. La mayor prevalencia del VDVB observado en animales de más edad es debido a que el VDVB induce altos niveles de anticuerpos que persisten por largo tiempo para luego declinar en forma lenta (Brownlie, 1991; Fredriksen *et al.*, 1999). Así mismo, Houe (1995) indica que la prevalencia viral tiende a incrementarse en áreas con alta densidad de animales, especialmente en hatos de crianza intensiva o en lugares con severos cambios climáticos donde los animales son confinados durante el invierno. En la provincia de San Pablo los cambios climáticos no son severos, tampoco existe alta densidad de animales por área y el sistema de crianza es extensivo. Estas variables podrían contribuir a una ineficiente distribución del virus en la población bovina de esta zona.

Los títulos de anticuerpos tuvieron un rango entre 2 a mayor a 256. El $56.7 \pm 9.5\%$ (59/104) de los animales tuvieron un título de anticuerpos entre 128 y mayores a 256 correspondiendo el $60.3 \pm 9.4\%$ (50/83) a animales mayores a 12 meses de edad (Cuadro 4). Estos resultados concuerdan con el estudio de Mainar-Jaime *et al.* (2001) donde demuestran que a mayor edad de los animales, mayor seropositividad a anticuerpos. Sin embargo, 3 de los terneros entre 2 a menores a 6 meses de edad tuvieron anticuerpos entre 128 y mayores a 256. No se conoce la historia de los terneros menores a 6 meses de edad seropositivos al VDVB con títulos altos, por lo que podría corresponder a anticuerpos pasivos o a infecciones de reciente introducción al rebaño.

En el Perú la infección por el VDVB es principalmente de tipo subclínico posiblemente debido a la benignidad del clima y/o menor densidad de la población bovina (Contreras *et al.*, 2000). Los resultados obtenidos en el presente estudio evidencian que el VDVB está moderadamente difundido en el ganado bovino de crianza extensiva en la provincia de San Pablo, departamento de Cajamarca, y su rol podría ser el de una agente primario en la ocurrencia de problemas respiratorios, infertilidad, entre otros, pero podría estar siendo confundido con otros problemas, como desnutrición, parasitosis, entre otros.

VI. CONCLUSIONES

- Existen anticuerpos contra el virus de la diarrea viral bovina en bovinos criollos de la provincia de San Pablo, departamento de Cajamarca.
- La seroprevalencia del virus de la diarrea viral en bovinos fue inferior ($27.1 \pm 4.4\%$ [104/385]) a lo detectado en otras zonas andinas del país.
- No existió asociación estadística entre las variables sexo, grupo etario y seropositividad contra el virus de la diarrea viral bovina en la población de bovinos estudiado.

VIII. BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. **Agapov EV, Murray CL, Frolov I, Qu L, Myers TM, Rice CM. 2004.** Uncleaved NS2-3 is required for production of infectious bovine viral diarrhea virus. *J Virol* 78(5):2414–2425.
2. **Aguilar R, Benito A, Rivera H. 2006.** Seroprevalencia del virus de la diarrea viral bovina en ganado lechero de crianza intensiva del valle de Lima. *Rev Inv Vet Perú* 17(2):148–153.
3. **Bachofen C, Stalder H, Braun U, Hilbe M, Ehrensperger F, Peterhans E. 2008.** Co-existence of genetically and antigenically diverse bovine viral diarrhoea viruses in an endemic situation. *Vet Microbiol* 131:93–102.
4. **Baxi M, McRae D, Baxi S, Greiser-Wilke I, Vilcek S, Amoako K, Deregt D. 2006.** A one-step multiplex real-time RT-PCR for detection and typing of bovine viral diarrhea viruses. *Vet Microbiol* 116:37–44.
5. **Becher P, Orlich M, Shannon AD, Horner G, König M. 1997.** Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. *J Gen Virol* 78:1357–1366.
6. **Becher P, Orlich M, Thiel HJ. 2000.** Mutations in the 5' nontranslated region of bovine viral diarrhea virus result in altered growth characteristics. *J Virol* 74(17):7884–7894.
7. **Benito A, Chacón J, Rivera H. 2001.** Técnicas diagnósticas disponibles para el estudio de la diarrea viral bovina en el Perú. *Rev Inv Vet Perú, Supl* 1:387–389.

8. **Betancur CA, Gogorza LM, Martinez FG. 2007.** Seroepidemiología de la diarrea viral bovina en Montería (Córdoba, Colombia). *Analecta Veterinaria* 27(2):11–16.
9. **Bolin SR, Ridpath JF. 1992.** Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhoea viruses in calves. *Am J Vet Res* 53(11):2157–2163.
10. **Bolin SR, Grooms DL. 2004.** Origination and consequences of bovine viral diarrhoea virus diversity. *Vet Clin Food Anim* 20:51–68.
11. **Bollo E. 2007.** Nanotechnologies applied to veterinary diagnostics. *Vet Res Com* 31(Suppl. 1):145–147.
12. **Botton SA, Da-Silva AM, Brum MC, Weiblen R, Flores EF. 1998.** Antigenic characterization of Brazilian bovine viral diarrhoea virus isolates by monoclonal antibodies and cross-neutralization. *Braz J Med Biol Res* 31(11): 1429–1438.
13. **Brackenbury LS, Carr BV, Charleston B. 2003.** Aspects of the innate and adaptive immune responses to acute infections with BVDV. *Vet Microbiol* 96:337–344.
14. **Brock KV. 2003.** The persistence of bovine viral diarrhoea virus. *Biologicals* 31:133–135.
15. **Brock KV. 2004.** Strategies for the control and prevention of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin Food Anim* 20:171–180.
16. **Brodersen BW. 2004.** Immunohistochemistry used as a screening method for persistent bovine viral diarrhoea virus infection. *Vet Clin Food Anim* 20:85–93.
17. **Brownlie J. 1991.** The pathways for bovine virus diarrhoea virus biotypes in the pathogenesis of disease. *Arch Virol [Suppl 3]:*79–96.
18. **Brownlie J, Hooper LB, Thompson I, Collins ME. 1998.** Maternal recognition of foetal infection with bovine virus diarrhoea virus (BVDV)–the bovine pestivirus. *Clin Diag Virol* 10:141–150.
19. **Cabello K, Quispe R, Rivera H. 2006.** Frecuencia de los virus parainfluenza-3, respiratorio sincitial y diarrea viral bovina en un rebaño mixto de una comunidad campesina de Cusco. *Rev Inv Vet Perú* 17(2):167–172.
20. **Campbell JR. 2004.** Effect of bovine viral diarrhoea virus in the feedlot. *Vet Clin Food Anim* 20:39–50.

21. **Chacón J, Benito A, Rivera H. 2003.** Detección de animales portadores del virus de la diarrea viral bovina en un establo vacunado y en otro sin vacunar del valle de Lima. *Rev Acad Perú Cienc Vet* 3(1):14–23.
22. **Charleston B, Fray MD, Baigent S, Carr V, Morrison WI. 2001.** Establishment of persistent infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus in cattle is associated with a failure to induce type I interferon. *J Gen Virol* 82:1893–1897.
23. **Charleston B, Brackenbury LS, Carr BV, Fray MD, Hope JC, Howard CJ, Morrison WI. 2002.** Alpha/Beta and Gamma Interferons Are Induced by Infection with Noncytopathic Bovine Viral Diarrhea Virus In Vivo. *J Virol* 76(2):923–927.
24. **Chase CC, Elmowalid G, Yousif AA. 2004.** The immune response to bovine viral diarrhea virus: a constantly changing picture. *Vet Clin Food Anim* 20: 95–114.
25. **Chimeno S, Leunda MR, Odeón A, Taboga O. 2007.** Recombinant E2 glycoprotein of bovine viral diarrhea virus induces a solid humoral neutralizing immune response but fails to confer total protection in cattle. *Braz J Med Biol Res* 40:813–818.
26. **Choi KH, Gallei A, Becher P, Rossmann MG. 2006.** The structure of bovine viral diarrhea virus RNA-dependent RNA polymerase and its amino-terminal domain. *Structure* 14:1107–1113.
27. **Contreras G, Ståhl K, Arana C, Rivera H. 2000.** Anticuerpos contra el virus de la diarrea viral bovina en muestras de leche de bovinos del valle del Mantaro (Jauja, Concepción y Huancayo). *Rev Inv Vet Perú* 11(1):58–65.
28. **Collen T, Morrison WI. 2000.** CD4⁺ T-cell responses to bovine viral diarrhoea virus in cattle. *Virus Res* 67:67–80.
29. **Daniel W. 1994.** Bioestadística: base para el análisis de las ciencias de la salud. De la 5ª edición en inglés. Uteha Noriega editores – México, págs.: 197, 198, 205 y 206.
30. **Deregt D, Dubovi EJ, Jolley ME, Nguyen P, Burton KM, Gilbert SA. 2005.** Mapping of two antigenic domains on the NS3 protein of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. *Vet Microbiol* 108:13–22.

31. **Edmondson MA, Givens MD, Walz PH, Gard JA, Stringfellow DA, Carson RL. 2007.** Comparison of tests for detection of bovine viral diarrhoea virus in diagnostic samples. *J Vet Diagn Invest* 19:376–381.
32. **Elahi SM, Shen SH, Harpin S, Talbot BG, Elazhary Y. 1999.** Investigation of the immunological properties of the bovine viral diarrhoea virus protein NS3 expressed by an adenovirus vector in mice. *Arch Virol* 144: 1057–1070.
33. **Endsley JJ, Roth JA, Ridpath JF, Neill J. 2003.** Maternal antibody blocks humoral but not T cell responses to BVDV. *Biologicals* 31:123–125.
34. **Endsley JJ, Ridpath JF, Neill JD, Sandbulte MR, Roth JA. 2004.** Induction of T lymphocytes specific for bovine viral diarrhoea virus in calves with maternal antibody. *Viral Immunol* 17(1):13–23.
35. **Fan ZC, Wang HW. 2009.** Regeneration and characterization of a recombinant bovine viral diarrhoea virus and determination of its efficacy to cross the bovine placenta. *Virus Genes* 38:129–135.
36. **Ferrari G, Scicluna MT, Bonvicini D, Gobbi C, Della Verità F, Valentini A, Autorino GL. 1999.** Bovine virus diarrhoea (BVD) control programme in an area in the Rome province (Italy). *Vet Microbiol* 64:237–245.
37. **Flores EF, Gil LH, Botton SA, Weiblen R, Ridpath JF, Kreutz LC, Pilati C, Driemeyer D, Moojen V, Wendelstein A. 2000.** Clinical, pathological and antigenic aspects of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) type 2 isolates identified in Brazil. *Vet Microbiol* 77:175–183.
38. **Flores EF, Ridpath JF, Weiblen R, Vogel FS, Gil LH. 2002.** Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhoea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. *Virus Res* 87:51– 60.
39. **Fredriksen B, Sandvik T, Løken T, Ødegaard SA. 1999.** Level and duration of serum antibodies in cattle infected experimentally and naturally with bovine virus diarrhoea virus. *The Vet Record* 30:111–114.
40. **Fulton RW, Saliki JT, Burge LJ, d'Offay JM, Bolin SR, Maes RK, Baker JC, Frey ML. 1997.** Neutralizing antibodies to type 1 and 2 bovine viral diarrhoea viruses: detection by inhibition of viral cytopathology and infectivity by immunoperoxidase assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 4(3):380–383.

41. **Fulton RW. 2000.** Bovine viral diarrhea virus cytopathic and noncytopathic biotypes and type 1 and 2 genotypes in diagnostic laboratory accessions: clinical and necropsy samples from cattle. *J Vet Diagn Invest* 12:33–38.
42. **Fulton RW, Ridpath JF, Confer AW, Saliki JT, Burge LJ, Payton ME. 2003.** Bovine viral diarrhoea virus antigenic diversity: impact on disease and vaccination programmes. *Biologicals* 31:89–95.
43. **Fulton RW, Ridpath JF, Ore S, Confer AW, Saliki JT, Burge LJ, Payton ME. 2005.** Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) subgenotypes in diagnostic laboratory accessions: Distribution of BVDV1a, 1b, and 2a subgeotypes. *Vet Microbiol* 111:35–40.
44. **Goyal SM, Ridpath JF. 2005.** Bovine Viral Diarrhea Virus. Diagnosis, Management, and Control. Blackwell Publishing – USA, 260 pp.
45. **Gray EW, Nettleton PF. 1987.** The ultrastructure of cell cultures infected with border disease and bovine virus diarrhoea viruses. *J Gen Virol* 68:2339–2346.
46. **Gripshover EM, Givens MD, Ridpath JF, Brock KV, Whitley EM. 2007.** Variation in E^{ms} viral glycoprotein associated with failure of immunohistochemistry and commercial antigen capture ELISA to detect a field strain of bovine viral diarrhea virus. *Vet Microbiol* 125:11–21.
47. **Grooms DL, Brock KV, Ward LA. 1998.** Detection of bovine viral diarrhea virus in the ovaries of cattle acutely infected with bovine viral diarrhea virus. *J Vet Diagn Invest* 10:125–129.
48. **Grooms DL. 2004.** Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhea virus. *Vet Clin Food Anim* 20:5–19.
49. **Grooms DL. 2006.** Reproductive losses caused by bovine viral diarrhea virus and leptospirosis. *Theriogenology* 66:624–628.
50. **Harada T, Tautz N, Thiel HJ. 2000.** E2-p7 region of the bovine viral diarrhea virus polyprotein: processing and functional studies. *J Virol* 74(20):9498–9506.
51. **Hilbe M, Stalder H, Peterhans E, Haessig M, Nussbaumer M, Egli C, Schelp C, Zlinszky K, Ehrensperger F. 2007.** Comparison of five diagnostic methods for detecting bovine viral diarrhea virus infection in calves. *J Vet Diagn Invest* 19:28–34.

52. **Houe H. 1995.** Epidemiology of Bovine Viral Diarrhea Virus. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.* 11(3):521–547.
53. **Houe H. 1999.** Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet Microbiol* 64:89–107.
54. **Houe H. 2003.** Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals* 31:137–143.
55. **Houe H, Lindberg A, Moenning V. 2006.** Test strategies in bovine viral diarrhea virus control and eradication campaigns in Europe. *J Vet Diagn Invest* 18:427–436.
56. **Huamán JC, Rivera H, Araínga M, Gavidia C, Manchego A. 2007.** Diarrea viral bovina y animales portadores del virus en hatos productores de leche de la irrigación de Majes, Arequipa. *Rev Inv Vet Perú* 18(2):141–149.
57. **Hult L, Lindberg A. 2005.** Experiences from BVDV control in Sweden. *Prev Vet Med* 72:143–148.
58. **Iqbal M, Flick-Smith H, McCauley W. 2000.** Interactions of bovine viral diarrhea virus glycoprotein E^{ms} with cell surface glycosaminoglycans. *J Gen Virol* 81:451–459.
59. **[INEI] Instituto Nacional de Estadística e Informática. 1996.** Censo Nacional Agropecuario INEI, Ministerio de Agricultura. Lima. Tomo III y IV: 2146–2235.
60. **Isken O, Grassmann CW, Yu H, Behrens SE. 2004.** Complex signals in the genomic 3' nontranslated region of bovine viral diarrhea virus coordinate translation and replication of the viral RNA. *RNA* 10(10):1637–1652.
61. **Jayashi C, Gavidia C, Araínga M, Manchego A, Rivera H. 2005.** Dinámica de seroconversión en hembras bovinas post eliminación de animales portadores del virus de la diarrea viral bovina. *Rev Inv Vet Perú* 16(1): 56–64.
62. **Johnson CM, Perez DR, French R, Merrick WC, Donis RO. 2001.** The NS5A protein of bovine viral diarrhoea virus interacts with the α subunit of translation elongation factor-1. *J Gen Virol* 82: 2935–2943.
63. **Kóvacs F, Magyar T, Rinehart C, Elbers K, Schlesinger K, Ohnesorge WC. 2003.** The live attenuated bovine viral diarrhea virus components of a multi-valent vaccine confer protection against fetal infection. *Vet Microbiol* 96:117–131.

64. **Lambot M, Douart A, Joris E, Letesson JJ, Pastoret PP. 1997.** Characterization of the immune response of cattle against non-cytopathic and cytopathic biotypes of bovine viral diarrhoea virus. *J Gen Virol* 78:1041–1047.
65. **Lértora WJ. 2003.** Diarrea viral bovina: actualización. *Rev Vet* 14(1):42–50.
66. **Leyssen P, De Clerco E, Neyts J. 2000.** Perspectives for the treatment of infections with *Flaviviridae*. *Clin Microbiol Rev* 13(1):67–82.
67. **Li Y, McNally J. 2001.** Characterization of RNA synthesis and translation of bovine viral diarrhoea virus (BVDV). *Virus Genes* 23(2):149–155.
68. **Lindberg A, Brownlie J, Gunn GJ, Houe H, Moennig V, Saatkamp HW, Sandvik T, Valle PS. 2006.** The control of bovine viral diarrhoea virus in Europe: today and in the future. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 25(3):961–979.
69. **Mahlum CE, Haugerud S, Shivers JL, Rossow KD, Goyal SM, Collins JE, Faaborg KS. 2002.** Detection of bovine viral diarrhoea virus by TaqMan® reverse transcription polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 14:120–125.
70. **Mainar-Jaime RC, Berzal-Herranz B, Arias P, Rojo-Vázquez FA. 2001.** Epidemiological pattern and risk factors associated with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in a non-vaccinated dairy-cattle population from the Asturias region of Spain. *Prev Vet Med* 52:63–73.
71. **Mars MH, Van Maanen C. 2005.** Diagnostic assays applied in BVDV control in The Netherlands. *Preventive Veterinary Medicine* 72:43–48.
72. **Maurer K, Krey T, Moennig V, Thiel HJ, Rümenapf T. 2004.** CD46 is a cellular receptor for bovine viral diarrhoea virus. *J Virol* 78(4):1792–1799.
73. **[MINAG] Ministerio de Agricultura del Perú. 1996.** Producción pecuaria e industria avícola. Presidencia de la República. Documento de consulta.
74. **Moennig V, Eicken K, Flebbe U, Frey HR, Grummer B, Haas L, Greiser-Wilke I, Liess B. 2005.** Implementation of two-step vaccination in the control of bovine viral diarrhoea (BVD). *Prev Vet Med* 72:109–114.
75. **Morales S, Benito A, Rivera H. 2003.** Terneros persistentemente infectados con el virus de la diarrea viral bovina en dos hatos lecheros de la provincia de Arequipa. *Rev Acad Perú Cienc Vet* 3(1):8–13.

76. **Morán P, Di Santo M, Gogorza L. 2006.** Transmisión del virus del virus de la diarrea viral bovina. Factores de riesgo en el ingreso y diseminación en los rodeos. *Rev Vet* 17(1):50–56.
77. **Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ. 1999.** *Veterinary Virology*. Third Edition. USA, pág.: 39.
78. **Murray CL, Jones CT, Rice CM. 2008.** Architects of assembly: roles of *Flaviviridae* non-structural proteins in virion morphogenesis. *Nat Rev Microbiol* 6:699–708.
79. **Nagai M, Hayashi M, Itou M, Fukutomi T, Akashi H, Kida H, Sakoda Y. 2008.** Identification of new genetic subtypes of bovine viral diarrhea virus genotype 1 isolated in Japan. *Virus Genes* 36:135–139.
80. **Niskanen R, Lindberg A. 2003.** Transmission of bovine viral diarrhea virus by unhygienic vaccination procedures, ambient air, and from contaminated pens. *Vet J* 165:125–130.
81. **Odeón AC, Risatti G, Kaiser GG, Leunda MR, Odriozola E, Campero CM, Donis RO. 2003.** Bovine viral diarrhea virus genomic associations in mucosal disease, enteritis and generalized dermatitis outbreaks in Argentina. *Vet Microbiol* 96:133–144.
82. **[OIE] Organización Mundial de Sanidad Animal. 2004.** Capítulo 2.10.6. Diarrea Vírica Bovina. Manual de la OIE sobre animales terrestres, pág.:1127–1140.
83. **Peterhans E, Jungi TW, Schweizer M. 2003.** BVDV and innate immunity. *Biologicals* 31:107–111.
84. **Pizarro-Lucero J, Celedón MO, Aguilera M, De Calisto A. 2006.** Molecular characterization of pestiviruses isolated from bovines in Chile. *Vet Microbiol* 115:208–217.
85. **Potgieter L. 1995.** Immunology of Bovine Viral Diarrhea Virus. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 11(3):501–520.
86. **[PRODEGAN] Programa de Desarrollo Ganadero. 2003.** Diagnóstico situacional de la actividad pecuaria de la provincia de San Pablo. Municipalidad de San Pablo – Cajamarca. Bol N°2:5–11.

87. **Qu L, McMullan LK, Rice C. 2001.** Isolation and characterization of noncytopathic pestivirus mutants reveals a role for nonstructural protein NS4B in viral cytopathogenicity. *J Virol* 75(22):10651–10662.
88. **Quispe R, Ccama A, Rivera H, Araínga M. 2008.** El virus de la diarrea viral en bovinos criollos de la provincia de Melgar, Puno. *Rev Inv Vet Perú* 19(2):176–182.
89. **Rhodes SG, Cocksedge JM, Collins RA, Morrison WI. 1999.** Differential cytokine responses of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in response to bovine viral diarrhoea virus in cattle. *J Gen Virol* 80:1673–1679.
90. **Ridpath J, Neill J, Frey M. 2000.** Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. *Vet Microbiol.* 77:145– 155.
91. **Ridpath JF. 2003.** BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control. *Biologicals* 31:127–131.
92. **Ridpath JF, Neill JD, Vilcek S, Dubovi EJ, Carman S. 2006.** Multiple outbreaks of severe acute BVDV in North America occurring between 1993 and 1995 linked to the same BVDV2 strain. *Vet Microbiol* 114:196–204.
93. **Rivera H. 1993.** El virus de la diarrea viral bovina (DVB). *Rev Inv Pec IVITA (Perú)* 6(1):1–6.
94. **Rivera H, Valdivia L, Benito A. 2001.** Diarrea viral bovina en bovinos lecheros de crianza semi-intensiva de la provincia de Parinacochas, Ayacucho. *Rev Inv Vet, Supl* 1:380–381.
95. **Rivera H, Huamán K, Benito A, Díaz A, Arana C. 2003.** Prevalencia del virus de la diarrea viral bovina y animales portadores del virus en un hato lechero del valle del Mantaro. *Rev Acad Perú Cienc Vet* 3(1):1–7.
96. **Rivera H. 2008.** Evolución del conocimiento sobre la enfermedad de la diarrea viral bovina y su agente etiológico. *Rev Inv Vet Perú* 19(1): 93–112.
97. **Rondón I. 2006.** Diarrea Viral Bovina: Patogénesis e Inmunología. *Rev MVZ Córdoba.* 11(1):694–704.
98. **Rossmann W, Janacek R, Wilhelm E. 2005.** Control of BVDV-infection on common grassland—The key for successful BVDV-eradication in Lower Austria. *Prev Vet Med* 72:133–137.

99. **Saliki JT, Dubovi EJ. 2004.** Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. *Vet Clin Food Anim* 20:69–83.
100. **Sandvik T. 2004.** Progress of control and prevention programs for bovine viral diarrhea virus in Europe. *Vet Clin Food Anim* 20:151–169.
101. **Sentsui H, Nishimori T, Kirisiwa R, Morooka A. 2001.** Mucosal disease induced in cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus by antigenically different cytopathic virus. *Arch Virol* 146:993–1006.
102. **Shoemaker ML, Smirnova NP, Bielefeldt-Ohmann H, Austin KJ, Van Olphen A, Clapper JA, Hansen TR. 2009.** Differential expression of the type I interferon pathway during persistent and transient bovine viral diarrhea virus infection. *J Interf Cytok Res* 29(1):23–35.
103. **Ståhl K, Rivera H, Vågsholm I, Moreno-López J. 2002.** Bulk milk testing for antibody seroprevalence to BVDV and BHV-1 in a rural region of Peru. *Prev Vet Med* 56:193–202.
104. **Ståhl K, Benito A, Felmer R, Zuñiga J, Reinhardt G, Rivera H, Baule C, Moreno-López J. 2009.** Genetic diversity of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) from Peru and Chile. *Pesq Vet Bras* 29(1):41–44.
105. **St-Louis MC, Massie B, Archambault D. 2005.** The bovine viral diarrhea virus (BVDV) NS3 protein, when expressed alone in mammalian cells, induces apoptosis which correlates with caspase-8 and caspase-9 activation. *Vet Res* 36:213–227.
106. **Tajima M, Dubovi ED. 2005.** Genetic and clinical analyses of bovine viral diarrhea virus isolates from dairy operations in the United States of America. *J Vet Diagn Invest* 17:10–15.
107. **Tang F, Zhang C. 2007.** Evidence for positive selection on the E2 gene of bovine viral diarrhea virus type 1. *Virus Genes* 35:629–634.
108. **Tautz N, Harada T, Kaiser A, Rinck G, Behrens SE, Thiel HJ. 1999.** Establishment and characterization of cytopathogenic and noncytopathogenic pestivirus replicons. *J Virol* 73(11):9422–9432.

109. **Tautz N, Thiel HJ. 2003.** Cytopathogenicity of pestiviruses: cleavage of bovine viral diarrhea virus NS2-3 has to occur at a defined position to allow viral replication. *Arch Virol* 148:1405–1412.
110. **Thrusfield M. 1990.** *Epidemiología Veterinaria*. Editorial Acribia S.A., pgs.: 42, 170, 196, 223, 226 – 228 y 231.
111. **VanLeeuwen JA, Forsythe LA, Tiwari A, Chartier R. 2005.** Seroprevalence of antibodies against bovine leukemia virus, bovine viral diarrhea virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum* in dairy cattle in Saskatchewan. *Can Vet J* 46:56–58.
112. **Van Oirschot JT, Bruschke CJM, Van Rijn PA. 1999.** Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea. *Vet Microbiol* 64:169–183.
113. **Vilček Š, Paton DJ, Durkovic B, Strojny L, Ibata G, Moussa A, Loitsch A, Rossamanith W, Vega S, Scicluna MT, Palfi V. 2001.** Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch Virol* 146:99–115.
114. **Viral Zone. 2008.** Pestivirus (Molecular Biology). [Internet], [06 mayo 2009]. Disponible en: http://www.expasy.ch/viralzone/all_by_species/39.html
115. **Xu J, Mendez E, Caron PR, Lin C, Murcko MA, Collett MS, Rice CM. 1997.** Bovine viral diarrhea virus NS3 serine proteinase: Polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication. *J Virol* 71(7):5312–5322.
116. **Yamane D, Kato K, Tohya Y, Akashi H. 2008.** The relationship between the viral RNA level and upregulation of innate immunity in spleen of cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus. *Vet Microbiol* 129:69–79.
117. **Zimmer GM, Wentink GH, Bruschke C, Westenbrink FJ, Brinkhof J, De Goey I. 2002.** Failure of foetal protection after vaccination against an experimental infection with bovine virus diarrhea virus. *Vet Microbiol* 89:255–265.
118. **Zúñiga A, Rivera H, Araínga M, Manchego A. 2006.** Evaluación de anticuerpos contra el virus de la diarrea viral bovina de un hato en proceso de erradicación de la enfermedad. *Rev Inv Vet Perú* 17(1):44–50.

VIII. APÉNDICE

RESULTADOS VN-VDVB-SAN PABLO CAJAMARCA

0=Hembra
1= Macho

0 - 6 (1); 6 -12 (2)
mayor a 12 (3)

0=Negativo
1=Positivo

N°	SEXO	EDAD	GRUPO ETARIO	RESULTADO (VN)	TITULO DE ANTICUERPOS	INVERSA DE TITULOS
1	0	7 años	3	0	<1/2	<2
2	0	7 años	3	0	<1/2	<2
3	0	6 meses	2	0	<1/2	<2
4	0	6 años	3	0	<1/2	<2
5	0	5 años	3	0	<1/2	<2
6	0	9 años	3	0	<1/2	<2
7	0	3 meses	1	0	<1/2	<2
8	1	2 meses	1	0	<1/2	<2
9	0	3 meses	1	0	<1/2	<2
10	0	7 meses	2	0	<1/2	<2
11	0	3 meses	1	0	<1/2	<2
12	1	1,5 años	3	0	<1/2	<2
13	0	5 años	3	1	1\16	16
14	1	2 años	3	0	<1/2	<2
15	0	7 años	3	1	1\8	8
16	0	7 meses	2	0	<1/2	<2
17	0	2,5 años	3	0	<1/2	<2
18	0	6 meses	2	0	<1/2	<2
19	0	6 años	3	1	1\8	8
20	0	8 años	3	1	1\16	16
21	0	8 meses	2	0	<1/2	<2
22	0	9 meses	2	0	<1/2	<2
23	1	8 meses	2	0	<1/2	<2
24	1	8 meses	2	0	<1/2	<2
25	0	5 meses	1	0	<1/2	<2
26	0	1,5 años	3	1	>1/256	>256
27	0	1,5 años	3	0	<1/2	<2
28	0	2,5 años	3	0	<1/2	<2
29	0	6 meses	2	0	<1/2	<2
30	1	5 meses	1	0	<1/2	<2
31	1	6 meses	2	0	<1/2	<2
32	0	1 año	3	0	<1/2	<2
33	0	2 años	3	0	<1/2	<2
34	1	10 meses	2	0	<1/2	<2
35	0	3 años	3	0	<1/2	<2
36	0	4 meses	1	1	1\128	128
37	0	2 años	3	0	<1/2	<2
38	1	3 años	3	0	<1/2	<2
39	0	8 meses	2	1	1\4	4
40	0	1 año	3	0	<1/2	<2
41	0	4 años	3	0	<1/2	<2
42	1	4 meses	1	0	<1/2	<2
43	0	8 años	3	0	<1/2	<2
44	0	3 años	3	0	<1/2	<2
45	0	2años	3	0	<1/2	<2
46	1	4 años	3	0	<1/2	<2
47	0	2 años	3	0	<1/2	<2
48	0	5 años	3	0	<1/2	<2
49	0	8 años	3	0	<1/2	<2
50	0	6 años	3	1	1\16	16
51	0	4 años	3	1	1\32	32
52	0	10 meses	2	0	<1/2	<2
53	0	7 años	3	0	<1/2	<2

54	1	8 meses	2	1	1\4	4
55	0	1 año	3	0	<1/2	<2
56	0	3 años	3	0	<1/2	<2
57	1	4 años	3	0	<1/2	<2
58	0	11 meses	2	0	<1/2	<2
59	1	3 meses	1	0	<1/2	<2
60	0	3 años	3	0	<1/2	<2
61	0	5 años	3	0	<1/2	<2
62	0	3 años	3	0	<1/2	<2
63	0	5 meses	1	0	<1/2	<2
64	1	6 años	3	1	1\8	8
65	0	4 años	3	1	1\16	16
66	0	1 año	3	1	1\128	128
67	0	5 años	3	0	<1/2	<2
68	1	8 años	3	1	1\32	32
69	0	4 años	3	0	<1/2	<2
70	0	1 año	3	0	<1/2	<2
71	1	1,5 años	3	1	1\16	16
72	0	2 años	3	0	<1/2	<2
73	0	4 años	3	0	<1/2	<2
74	0	8 meses	2	0	<1/2	<2
75	1	10 meses	2	0	<1/2	<2
76	0	7 años	3	0	<1/2	<2
77	1	5 meses	1	0	<1/2	<2
78	0	4 años	3	0	<1/2	<2
79	0	5 años	3	0	<1/2	<2
80	0	3 años	3	0	<1/2	<2
81	0	1,5 años	3	1	1\64	64
82	1	1 año	3	0	<1/2	<2
83	0	3 años	3	0	<1/2	<2
84	0	1 año	3	1	1\8	8
85	0	3 meses	1	0	<1/2	<2
86	0	4 años	3	0	<1/2	<2
87	0	6 años	3	0	<1/2	<2
88	0	11 meses	2	1	1\32	32
89	0	8 años	3	0	<1/2	<2
90	1	4 meses	1	0	<1/2	<2
91	0	7 años	3	0	<1/2	<2
92	1	9 meses	2	0	<1/2	<2
93	0	1 año	3	1	>1\256	>256
94	0	7 años	3	0	<1/2	<2
95	0	4 años	3	0	<1/2	<2
96	1	5 años	3	0	<1/2	<2
97	0	7 meses	2	0	<1/2	<2
98	0	6 años	3	0	<1/2	<2
99	1	4 años	3	0	<1/2	<2
100	0	5 años	3	0	<1/2	<2
101	0	1 año	3	0	<1/2	<2
102	1	1,5 años	3	1	1\8	8
103	0	4 años	3	0	<1/2	<2
104	0	3 años	3	0	<1/2	<2
105	0	6 años	3	0	<1/2	<2
106	1	2 años	3	0	<1/2	<2
107	0	5 años	3	0	<1/2	<2
108	0	1 año	3	0	<1/2	<2
109	1	4 años	3	0	<1/2	<2
110	0	6 años	3	0	<1/2	<2
111	0	1 año	3	1	1\8	8

112	1	10 meses	2	0	<1/2	<2
113	0	5 meses	1	1	1\32	32
114	1	5 años	3	0	<1/2	<2
115	0	2 años	3	0	<1/2	<2
116	0	1,5 años	3	1	1\32	32
117	0	4 años	3	0	<1/2	<2
118	0	5 años	3	0	<1/2	<2
119	0	1,5 años	3	1	1\8	8
120	1	3 años	3	0	<1/2	<2
121	0	4 años	3	0	<1/2	<2
122	0	10 meses	2	0	<1/2	<2
123	0	4 años	3	0	<1/2	<2
124	1	2 años	3	0	<1/2	<2
125	1	9 meses	2	0	<1/2	<2
126	0	6 años	3	0	<1/2	<2
127	0	2 años	3	0	<1/2	<2
128	0	4 meses	1	0	<1/2	<2
129	0	4 años	3	0	<1/2	<2
130	1	5 años	3	0	<1/2	<2
131	0	2 años	3	0	<1/2	<2
132	0	5 años	3	0	<1/2	<2
133	0	4 años	3	0	<1/2	<2
134	0	1 año	3	0	<1/2	<2
135	0	2 años	3	0	<1/2	<2
136	1	6 años	3	0	<1/2	<2
137	0	3 años	3	0	<1/2	<2
138	0	9 meses	2	1	1\128	128
139	1	4 años	3	0	<1/2	<2
140	0	1,5 años	3	1	>1\256	>256
141	0	3 años	3	0	<1/2	<2
142	1	11 meses	2	0	<1/2	<2
143	1	5 meses	1	0	<1/2	<2
144	0	5 años	3	0	<1/2	<2
145	0	4 años	3	0	<1/2	<2
146	1	7 años	3	0	<1/2	<2
147	0	4 años	3	0	<1/2	<2
148	0	3 años	3	0	<1/2	<2
149	0	1 año	3	1	1\128	128
150	1	7 meses	2	0	<1/2	<2
151	0	1 año	3	0	<1/2	<2
152	0	5 años	3	0	<1/2	<2
153	1	4 años	3	0	<1/2	<2
154	0	11 meses	2	0	<1/2	<2
155	0	4 años	3	0	<1/2	<2
156	0	6 años	3	0	<1/2	<2
157	0	3 años	3	0	<1/2	<2
158	1	2 años	3	0	<1/2	<2
159	1	6 años	3	0	<1/2	<2
160	0	1,5 años	3	1	>1\256	>256
161	0	2 años	3	0	<1/2	<2
162	0	1 año	3	0	<1/2	<2
163	1	11 meses	2	1	>1\256	>256
164	0	3 años	3	0	<1/2	<2
165	0	5 años	3	0	<1/2	<2
166	1	4 años	3	0	<1/2	<2
167	0	2 años	3	0	<1/2	<2
168	0	4 meses	1	0	<1/2	<2
169	0	5 años	3	0	<1/2	<2

170	0	3 años	3	0	<1/2	<2
171	0	1,5 años	3	1	1\64	64
172	1	3 años	3	0	<1/2	<2
173	0	4 años	3	0	<1/2	<2
174	0	8 meses	2	0	<1/2	<2
175	1	10 meses	2	0	<1/2	<2
176	0	7 años	3	0	<1/2	<2
177	1	2 años	3	0	<1/2	<2
178	0	7 años	3	0	<1/2	<2
179	1	3 años	3	0	<1/2	<2
180	0	2 años	3	0	<1/2	<2
181	0	4 años	3	0	<1/2	<2
182	1	5 años	3	0	<1/2	<2
183	0	3 años	3	0	<1/2	<2
184	0	4 años	3	0	<1/2	<2
185	0	1 año	3	1	>1\256	>256
186	1	1 año	3	1	>1\256	>256
187	0	10 meses	2	0	<1/2	<2
188	0	3 años	3	0	<1/2	<2
189	0	6 años	3	0	<1/2	<2
190	1	2 meses	1	0	<1/2	<2
191	0	4 años	3	0	<1/2	<2
192	0	3 años	3	0	<1/2	<2
193	0	1 año	3	0	<1/2	<2
194	1	5 años	3	0	<1/2	<2
195	0	1,5 años	3	1	1\128	128
196	0	4 meses	1	0	<1/2	<2
197	0	1 año	3	1	>1\256	>256
198	1	3 años	3	0	<1/2	<2
199	0	9 meses	2	0	<1/2	<2
200	0	1,5 años	3	1	>1\256	>256
201	0	1 año	3	1	>1\256	>256
202	1	11 meses	2	1	>1\256	>256
203	0	1 año	3	1	>1\256	>256
204	0	1 año	3	1	>1\256	>256
205	0	4 años	3	0	<1/2	<2
206	1	1,5 años	3	1	>1\256	>256
207	0	1 año	3	1	>1\256	>256
208	0	1 año	3	1	>1\256	>256
209	0	6 años	3	0	<1/2	<2
210	1	5 meses	1	0	<1/2	<2
211	0	4 años	3	0	<1/2	<2
212	0	1,5 años	3	1	>1\256	>256
213	0	9 meses	2	1	1\32	32
214	1	1 año	3	1	>1\256	>256
215	0	1,5 años	3	1	>1\256	>256
216	0	1 año	3	1	>1\256	>256
217	0	2 años	3	1	>1\256	>256
218	0	4 años	3	0	<1/2	<2
219	0	5 años	3	0	<1/2	<2
220	0	3 años	3	0	<1/2	<2
221	0	4 años	3	0	<1/2	<2
222	1	2 años	3	0	<1/2	<2
223	0	4 meses	1	0	<1/2	<2
224	0	2 años	3	0	<1/2	<2
225	1	3 años	3	0	<1/2	<2
226	0	2 años	3	0	<1/2	<2
227	0	1,5 años	3	1	1\128	128

228	0	4 años	3	0	<1/2	<2
229	0	10 meses	2	0	<1/2	<2
230	1	5 años	3	0	<1/2	<2
231	0	4 años	3	0	<1/2	<2
232	0	7 años	3	0	<1/2	<2
233	1	5 meses	1	1	1\64	64
234	0	4 años	3	0	<1/2	<2
235	0	5 años	3	0	<1/2	<2
236	0	4 años	3	0	<1/2	<2
237	0	1 año	3	1	>1\256	>256
238	0	7 meses	2	0	<1/2	<2
239	1	10 meses	2	1	1\8	8
240	0	5 años	3	0	<1/2	<2
241	0	2 años	3	0	<1/2	<2
242	1	4 años	3	0	<1/2	<2
243	0	6 años	3	0	<1/2	<2
244	0	3 meses	1	1	1\64	64
245	0	1 año	3	1	1\32	32
246	0	3 años	3	0	<1/2	<2
247	1	11 meses	2	0	<1/2	<2
248	0	4 años	3	0	<1/2	<2
249	0	6 años	3	0	<1/2	<2
250	0	2 años	3	1	1\32	32
251	0	6 meses	2	0	<1/2	<2
252	0	5 años	3	0	<1/2	<2
253	0	8 años	3	0	<1/2	<2
254	0	2 años	3	0	<1/2	<2
255	1	7 meses	2	0	<1/2	<2
256	0	3 años	3	0	<1/2	<2
257	1	1 año	3	0	<1/2	<2
258	0	3 años	3	0	<1/2	<2
259	0	4 años	3	0	<1/2	<2
260	0	9 meses	2	0	<1/2	<2
261	0	5 años	3	0	<1/2	<2
262	1	4 años	3	0	<1/2	<2
263	0	2 años	3	0	<1/2	<2
264	0	3 años	3	0	<1/2	<2
265	0	1 año	3	1	1\128	128
266	0	5 meses	1	0	<1/2	<2
267	1	2 años	3	1	1\64	64
268	0	1,5 años	3	0	<1/2	<2
269	0	3 años	3	0	<1/2	<2
270	0	10 meses	2	0	<1/2	<2
271	1	9 meses	2	0	<1/2	<2
272	0	6 años	3	0	<1/2	<2
273	0	7 años	3	0	<1/2	<2
274	1	8 meses	2	0	<1/2	<2
275	0	4 años	3	0	<1/2	<2
276	0	1,5 años	3	1	1\128	128
277	0	4 años	3	0	<1/2	<2
278	0	7 años	3	0	<1/2	<2
279	1	8 años	3	0	<1/2	<2
280	1	7 meses	2	0	<1/2	<2
281	0	8 meses	2	0	<1/2	<2
282	0	8 años	3	0	<1/2	<2
283	0	9 años	3	0	<1/2	<2
284	0	7 meses	2	0	<1/2	<2
285	0	6 años	3	0	<1/2	<2

286	1	2 años	3	0	<1/2	<2
287	0	6 años	3	0	<1/2	<2
288	0	4 meses	1	0	<1/2	<2
289	1	8 meses	2	0	<1/2	<2
290	0	3 años	3	0	<1/2	<2
291	0	2 años	3	0	<1/2	<2
292	0	4 años	3	0	<1/2	<2
293	0	1 año	3	0	<1/2	<2
294	1	10 meses	2	0	<1/2	<2
295	0	6 meses	2	0	<1/2	<2
296	0	6 años	3	0	<1/2	<2
297	0	2 años	3	0	<1/2	<2
298	1	3 meses	1	0	<1/2	<2
299	0	5 años	3	0	<1/2	<2
300	0	1 año	3	1	>1/256	>256
301	0	7 años	3	0	<1/2	<2
302	1	11 meses	2	0	<1/2	<2
303	0	3 años	3	0	<1/2	<2
304	1	1 año	3	1	1\64	64
305	0	1,5 años	3	1	>1/256	>256
306	0	9 meses	2	0	<1/2	<2
307	0	4 años	3	0	<1/2	<2
308	0	5 años	3	1	1\64	64
309	1	6 meses	2	0	<1/2	<2
310	0	6 años	3	0	<1/2	<2
311	0	1 año	3	1	>1/256	>256
312	0	1,5 años	3	1	>1/256	>256
313	0	10 meses	2	1	1\32	32
314	1	2 años	3	1	1\64	64
315	0	1 año	3	1	1\128	128
316	0	1,5 años	3	1	1\64	64
317	0	1 año	3	1	1\128	128
318	0	2 años	3	1	1\64	64
319	1	10 meses	2	1	1\8	8
320	0	1,5 años	3	1	1\32	32
321	0	1 año	3	1	1\32	32
322	0	1,5 años	3	1	1\64	64
323	1	2 meses	1	1	1\64	64
324	0	4 años	3	0	<1/2	<2
325	0	6 años	3	0	<1/2	<2
326	0	1 año	3	1	1\128	128
327	0	7 meses	2	0	<1/2	<2
328	0	1 año	3	0	<1/2	<2
329	1	1,5 años	3	1	1\4	4
330	0	3 meses	1	0	<1/2	<2
331	1	1 año	3	0	<1/2	<2
332	0	1,5 años	3	1	1\32	32
333	0	3 años	3	0	<1/2	<2
334	1	10 meses	2	0	<1/2	<2
335	0	6 años	3	0	<1/2	<2
336	0	1,5 años	3	1	>1\256	>256
337	0	1 año	3	1	>1\256	>256
338	0	9 meses	2	0	<1/2	<2
339	1	5 años	3	0	<1/2	<2
340	0	1 año	3	1	>1\256	>256
341	1	5 meses	1	0	<1/2	<2
342	0	2 años	3	0	<1/2	<2
343	0	1 año	3	0	<1/2	<2

344	1	6 años	3	0	<1/2	<2
345	0	1,5 años	3	1	>1\256	>256
346	0	5 años	3	0	<1/2	<2
347	1	9 meses	2	1	1\4	4
348	0	1 año	3	1	1\16	16
349	0	4 años	3	0	<1/2	<2
350	1	2 años	3	0	<1/2	<2
351	0	1,5 años	3	1	>1\256	>256
352	0	1 año	3	1	>1\256	>256
353	1	6 meses	2	0	<1/2	<2
354	0	11 meses	2	1	>1\256	>256
355	0	4 años	3	0	<1/2	<2
356	0	1,5 años	3	1	>1\256	>256
357	1	3 meses	1	0	<1/2	<2
358	0	1 año	3	1	1\64	64
359	0	4 años	3	0	<1/2	<2
360	1	4 meses	1	1	>1\256	>256
361	0	2 años	3	1	>1\256	>256
362	0	4 años	3	0	<1/2	<2
363	0	1 año	3	1	>1\256	>256
364	1	9 meses	2	1	>1\256	>256
365	0	1,5 años	3	1	>1\256	>256
366	0	7 meses	2	0	<1/2	<2
367	0	1 año	3	1	>1\256	>256
368	1	4 años	3	0	<1/2	<2
369	0	5 años	3	0	<1/2	<2
370	0	2 años	3	0	<1/2	<2
371	0	1 año	3	1	>1\256	>256
372	1	11 meses	2	0	<1/2	<2
373	0	1,5 años	3	1	1\128	128
374	0	3 años	3	0	<1/2	<2
375	1	1 año	3	1	1\64	64
376	1	4 meses	1	1	1\128	128
377	0	1,5 años	3	1	>1\256	>256
378	0	9 meses	2	0	<1/2	<2
379	0	2 años	3	1	>1\256	>256
380	1	1 año	3	1	>1\256	>256
381	0	1,5 años	3	1	>1\256	>256
382	0	3 años	3	0	<1/2	<2
383	0	6 años	3	0	<1/2	<2
384	1	7 meses	2	1	>1\256	>256
385	0	11 meses	2	0	<1/2	<2